



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE
 α -GLUCOSIDASAS DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS
DE *Bouvardia ternifolia* (Cav.) SCHLTDL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ARACELI TOBON LEZAMA



CDMX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesora: María Isabel Aguilar Laurents

VOCAL: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Profesora: Mabel Clara Fragoso Serrano

1er. SUPLENTE: Profesor: Mario Alberto Figueroa Saldívar

2° SUPLENTE: Profesora: Berenice Ovalle Magallanes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,
DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO

SUSTENTANTE:

ARACELI TOBON LEZAMA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios y así superarme.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por toda la confianza, los consejos, las enseñanzas y todo el apoyo que me brindó durante mi estancia y desarrollo de mi trabajo de estancia y tesis. Por ser una persona muy humana en todos los aspectos.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA), por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN222619, y al proyecto PAIP 5000-9131, ambos a cargo de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

A los miembros del jurado: Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. José Fausto Rivero Cruz y Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por el tiempo invertido en la revisión, corrección, sugerencias y consejos con respecto a este trabajo.

Al personal técnico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la investigación y a la industria (USAI) de la Facultad de Química, por el registro de los espectros para los análisis espectroscópicos y espectrométricos, particularmente a la M. en C. Nayeli López Balbiux, la Q. Marisela Gutiérrez, la QFB Margarita Guzmán y a la Dra. Minerva Monroy.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por el apoyo para la realización del ensayo biológico.

Al M. en C. Manuel Eduardo Rangel Grimaldo por su amabilidad, asesoría y apoyo técnico para la realización de las pruebas biológicas.

Al M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Unidad de Integración en Sistemática Vegetal y Suelo, FES Zaragoza, UNAM, por la aportación del material vegetal.

A los I.Q. Ramiro del Carmen y Roberto Díaz por la asistencia técnica informática.

DEDICATORIAS



ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | I |
| LISTA DE TABLAS..... | IV |
| LISTA DE FIGURAS | V |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 2 |
| 2.1 Familia Rubiaceae | 2 |
| 2.2 Características del género <i>Bouvardia</i> | 2 |
| 2.2.1 Género <i>Bouvardia</i> | 2 |
| 2.2.2 Distribución y hábitat..... | 2 |
| 2.3 Características de la especie <i>Bouvardia ternifolia</i> | 3 |
| 2.3.1 Clasificación taxonómica..... | 3 |
| 2.3.2 Descripción | 4 |
| 2.3.3 Distribución | 4 |
| 2.3.4 Hábitat | 5 |
| 2.3.5 Nombres comunes | 5 |
| 2.3.6 Usos..... | 5 |
| 2.3.7 Composición química..... | 6 |
| 2.3.8 Antecedentes farmacológicos | 9 |
| 2.4 Diabetes mellitus (DM)..... | 12 |
| 2.4.1 Tratamiento de la diabetes mellitus | 14 |
| 2.4.2 Plantas medicinales con propiedades antidiabéticas | 16 |
| 2.4.3 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. | 19 |
| 2.4.4 Inhibidores de α -glucosidasas obtenidos a partir de plantas medicinales | 21 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 24 |
| 4.1 Hipótesis..... | 24 |
| 4.2 Objetivo general..... | 24 |
| 4.3 Objetivos particulares | 24 |



| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. PARTE EXPERIMENTAL | 25 |
| 5.1 Material y equipo utilizado | 25 |
| 5.2 Material vegetal | 25 |
| 5.2.1 Preparación del extracto acuoso de <i>B. ternifolia</i> | 26 |
| 5.2.2 Fraccionamiento por reparto con AcOEt del extracto acuoso de <i>B. ternifolia</i> | 26 |
| 5.2.3 Fraccionamiento secundario del extracto acuoso de <i>B. ternifolia</i> (<i>n</i> -butanol) | 26 |
| 5.2.4 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción orgánica de AcOEt de la infusión de <i>B. ternifolia</i> | 26 |
| 5.2.5 Fraccionamiento de la fracción FI-M de <i>n</i> -butanol de la infusión de <i>B. ternifolia</i> | 27 |
| 5.2.6 Procesamiento de la fracción FI-A obtenida del segundo fraccionamiento del extracto acuoso de <i>B. ternifolia</i> | 28 |
| 5.2.7 Determinación del contenido de fenoles totales | 29 |
| 5.2.9 Determinación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de los extractos orgánicos y de sus fracciones..... | 31 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| 6.1 Análisis químico de la fracción de AcOEt | 33 |
| 6.2 Análisis de la fracción de <i>n</i> -butanol | 35 |
| 6.3 Determinación del contenido de fenoles totales. | 38 |
| 6.6 Determinación del contenido de flavonoides totales..... | 41 |
| 6.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos orgánicos y de sus fracciones sobre la enzima α -glucosidasa de levadura..... | 43 |
| 6.4.1 Evaluación del efecto del extracto de AcOEt | 43 |
| 6.3.1.1 Evaluación del efecto de la quercetina sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa | 44 |
| 6.3.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas del fraccionamiento con <i>n</i> -butanol. | 46 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 49 |
| 9. REFERENCIAS | 50 |
| 10. ANEXOS | 57 |



LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| TPA | 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol- |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| H₂SO₄ | Ácido sulfúrico |
| ADA | Asociación Americana de Diabetes |
| S | Azufre |
| Na₂CO₃ | Carbonato de sodio |
| C | Carbono |
| cm | Centímetro |
| CE₅₀ | Concentración efectiva media |
| CI₅₀ | Concentración inhibitoria media |
| J | Constante de acoplamiento |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| CCA | Cromatografía en columna abierta |
| HPLC-MS | Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas |
| δ | Desplazamiento químico |
| DM | Diabetes Mellitus |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPP | Dipeptidil peptidasa |
| dd | Doble de doble |
| d | Doblete |



| | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HSQC | Espectroscopía bidimensional de correlación única heteronuclear a un enlace (^1H - ^{13}C) |
| COSY | Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear (^1H - ^1H) |
| HMBC | Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a varios enlaces (^1H - ^{13}C) |
| NOESY | Espectroscopía bidimensional incrementada por el efecto nuclear Overhauser |
| EtOH | Etanol |
| °C | Grados Celsius |
| g | Gramo |
| Hz | Hertz |
| h | Horas |
| IGT | Individuos tolerantes a glucosa |
| IDF | Federación Internacional de Diabetes |
| i.p. | Intraperitoneal |
| ITIS | Sistema de Información Taxonómica Integrada |
| i.v. | Intravenosa |
| kg | Kilogramo |
| MHz | Megahertz |
| MeOH | Metanol |
| CD₃OD | Metanol deuterado |
| m | Metro |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| µg | Microgramo |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| mg | Miligramo |



| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| mL | Mililitro |
| mm | Milimetro |
| mM | Milimolar |
| min | Minuto |
| M | Molaridad |
| <i>n</i>-BuOH | <i>n</i> -Butanol |
| nm | Nanómetro |
| N | Normalidad |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| O | Oxígeno |
| % m/v | Porcentaje masa/volumen |
| ¹³C-RMN | Resonancia magnética nuclear de carbono |
| ¹H-RMN | Resonancia magnética nuclear de hidrógeno |
| SNC | Sistema nervioso central |
| [(NH₄)₄Ce(SO₄)₄•2H₂O] | Sulfato cérico amoniacal |
| TBARS | Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico |
| AlCl₃ | Tricloruro de aluminio |
| UV | Ultravioleta |



LISTA DE TABLAS

| | | Pág. |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla 1. | Clasificación taxonómica de la especie <i>B. ternifolia</i> . | 3 |
| Tabla 2. | Principales metabolitos secundarios aislados de <i>B. ternifolia</i> . | 6 |
| Tabla 3. | Principales agentes utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus. | 14 |
| Tabla 4. | Ejemplos de plantas con propiedades antidiabéticas. | 17 |
| Tabla 5. | Constituyentes fitoterapéuticos con actividad inhibitoria de α -glucosidasas obtenidos de productos naturales. | 22 |
| Tabla 6. | Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de AcOEt. | 27 |
| Tabla 7. | Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FI-M de <i>n</i> -butanol. | 27 |
| Tabla 8. | Fraccionamiento cromatográfico de la fracción Btm-7. | 28 |
| Tabla 9. | Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FI-A de <i>n</i> -butanol. | 29 |
| Tabla 10. | Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y ^{13}C de la quercetina. | 34 |
| Tabla 11. | Valores de concentración obtenidos de las tres réplicas para el análisis de fenoles totales. | 40 |
| Tabla 12. | Valores de concentración obtenidos de las tres réplicas para el análisis de flavonoides totales. | 42 |
| Tabla 13. | Resultados obtenidos de la evaluación sobre la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. | 46 |



| LISTA DE FIGURAS | | Pág. |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1. | Distribución geográfica del género <i>Bouvardia</i> en el mundo. | 3 |
| Figura 2. | Distribución geográfica de <i>Bouvardia ternifolia</i> en México y Estados Unidos. | 4 |
| Figura 3. | <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) Schlecht. (Rubiaceae). | 5 |
| Figura 4. | Número de personas con DM2 en el mundo. | 13 |
| Figura 5. | Ubicación de las enzimas α -glucosidasas. | 19 |
| Figura 6. | Estructura de la acarbosa. | 21 |
| Figura 7. | Estructura del miglitol y la voglibosa. | 21 |
| Figura 8. | Estructura de la quercetina y principales correlaciones observadas en el espectro HMBC. | 35 |
| Figura 9. | Cromatograma obtenido de la fracción FII-2. | 35 |
| Figura 10. | Estructura de la escopoletina. | 35 |
| Figura 11. | Estructura de la bouvardina y la desoxibouvardina. | 36 |
| Figura 12. | Cromatograma obtenido de la fracción FII-3. | 36 |
| Figura 13. | Estructura del ácido clorogénico. | 37 |
| Figura 14. | Estructura de la rutina. | 37 |
| Figura 15. | Estructura de 3-O-glucopiranosido de quercetina. | 37 |
| Figura 16. | Estructura de la rutina metilada. | 38 |
| Figura 17. | Estructura de 3-O-metil-ramnopiranosido de quercetina. | 38 |
| Figura 18. | Curva de calibración para determinar la cantidad total de fenoles utilizando como referencia ácido gálico. | 39 |
| Figura 19. | Representación gráfica de la reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu en la multiplaca. | 39 |
| Figura 20. | Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales utilizando como referencia a la quercetina. | 41 |
| Figura 21. | Curva de inhibición enzimática del extracto de AcOEt. | 44 |
| Figura 22. | Curva de inhibición enzimática de la acarbosa. | 45 |
| Figura 23. | Curva de inhibición enzimática de la quercetina. | 45 |
| Figura 24. | Curva de inhibición de la fracción FI-A. | 46 |



| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 25. | Curva de inhibición de la fracción BtA-9. | 47 |
| Figura 26. | Curva de inhibición de la fracción BtA-10. | 48 |
| Figura 27. | Curva de inhibición de la fracción FII-4. | 48 |
| Figura A1. | Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) del precipitado. | 57 |
| Figura A2. | Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) de la quercetina. | 58 |
| Figura A3. | Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, C ₃ OD- <i>d</i> ₄) de la quercetina. | 59 |
| Figura A4. | Espectro HSQC (400 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) de la quercetina. | 60 |
| Figura A5. | Espectro COSY (400 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) de la quercetina. | 61 |
| Figura A6. | Espectro HMBC (400 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) de la quercetina. | 62 |
| Figura A7. | Espectro NOESY (400 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) de la quercetina. | 63 |
| Figura A8. | Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) de la fracción BtA-9. | 64 |



1. INTRODUCCIÓN

Desde su existencia, el ser humano ha procurado su bienestar y gran parte lo ha encontrado en la naturaleza interaccionando con su entorno físico y aprovechando de manera óptima sus recursos (Cortez-Gallardo et al., 2004).

El uso de plantas medicinales para tratar problemas de salud es una práctica muy común en muchos países del mundo, ya que su conocimiento es milenario y ha trascendido por generaciones gracias a la tradición. Se considera que nuestros antepasados obtuvieron el conocimiento de muchas especies vegetales, después de distinguir entre las que tenían valor alimenticio y aquellas que tenían algún efecto en su organismo, por lo que a partir de esto empezaron a diferenciarlas y seleccionarlas. Actualmente, en México, la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se ha generado a partir de su estudio, mediante el análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, taxonómicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas que constituyen el contexto global de estudio de especies vegetales medicinales (Santillán, 2012).

La OMS desde el año 1978 ha reconocido la importancia de la medicina tradicional como una alternativa de salud para la población. Asimismo, la misma organización envió una serie de recomendaciones proporcionando a diversas autoridades sanitarias, alternativas que permitirán el paulatino mejoramiento de la salud de los pacientes por medio del desarrollo de bases de conocimientos y formulaciones de políticas nacionales (*Alma-Ata, 1978*). Aunque es relativamente fácil acceder a las plantas medicinales antes de utilizarlas es indispensable conocer sus propiedades, funciones, dosis y contraindicaciones (Sánchez, 2017). En esta tesis se presenta el análisis químico y farmacológico preliminar de la especie *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schlecht., la cual crece de forma nativa en México y ha sido utilizada de forma tradicional para fines medicinales.



2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Rubiaceae

La familia Rubiaceae es la cuarta familia más grande entre las plantas fanerógamas contando con unos 630 géneros y 10200 especies, la mayoría de ellas vegetan en la región tropical y juegan un papel importante en la vegetación de las llamadas zonas calientes (Mabberley 1997). Esta familia se caracteriza por ser árboles, arbustos, plantas erectas, postradas o trepadoras, a veces epifíticas, herbáceas o leñosas y se clasifica en cuatro subfamilias: Cinchonoidea, Ixoroideae, Rubioideae y Urophyllloideae (Andersson y Rova, 1999).

2.2 Características del género *Bouvardia*

2.2.1 Género *Bouvardia*

El género *Bouvardia* es un género cuyas flores son del orden de las Gentianales de la familia Rubiaceae, el género tiene 30 especies de hierbas y arbustos perennes, nativos de América tropical, entre las que destacan: *Bouvardia ternifolia*, *B. borhidiana*, *B. breviflora*, *B. glabra*, *B. latifolia*, *B. longiflora* (Cav.), *B. rzedowskii*, *B. multiflora* (Cav.) Schult, *B. hintoniorum*, *B. albiflora*, *B. capitata*, *B. castilloi*, *B. nívea*, *B. rekoj*, *B. rosea* y *B. scabra*, entre otras. Son arbustos o hierbas perennes que pueden alcanzar de los 60 hasta los 150 cm de altura, poseen hojas opuestas o en conjunto (3-5) de forma ovalada o lanceolada, las flores son terminales, generalmente en racimos y el color varía dependiendo de la especie, la corola es tubular con cuatro lóbulos (Zappi, 1993).

2.2.2 Distribución y hábitat

El hábitat difiere, pero a menudo crecen en un afloramiento rocoso de laderas empinadas o barrancas a elevaciones superiores a 500 msnm, las condiciones ambientales varían de xéricas a muy mésicas (Blackwell, 1968). En la **Figura 1** se muestra la distribución geográfica mundial del género *Bouvardia* (CONABIO, 2019).



Figura 1. Distribución geográfica del género *Bouvardia* en el mundo.

2.3 Características de la especie *Bouvardia ternifolia*

2.3.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica se presenta en la **Tabla 1** (ITIS, 2019).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *B. ternifolia*.

| Reino | Plantae |
|---------------|--------------------------------------|
| Subreino | Traqueobionta (plantas vasculares) |
| Superdivisión | Spermatophyta (plantas con semillas) |
| División | Magnoliophyta (plantas con flor) |
| Clase | Magnoliopsida (dicotiledóneas) |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Gentianales |
| Familia | Rubiaceae |
| Género | <i>Bouvardia</i> |
| Especie | <i>Bouvardia ternifolia</i> |



2.3.2 Descripción

Bouvardia ternifolia es un arbusto o planta herbácea perenne con numerosos tallos que en la juventud posee pelos blancos y cortos (**Figura 2**). La planta puede alcanzar de 0.3 a 1.5 m de altura. Las hojas comúnmente son verticiladas, 3 a 4 por nodo, con estípulas pequeñas, pecíolos de 0.5 a 11 mm de largo, láminas extremadamente variables (lineares, lanceoladas, elípticas, ovadas u obovadas). Las hojas con corola tubular de color rojo, salmón o naranja, externamente pubescente con pelos papilosos blancos, pero de ápices rojos. El fruto es una cápsula de 4.5 a 9 mm de largo y 5 a 10 mm de ancho, sin pelos o algo papilosas; semillas de 2 a 3.5 mm de ancho (Rzedowski y Rzedowski, 2005).

2.3.3 Distribución

Bouvardia ternifolia es nativa de Mesoamérica, crece desde el suroeste de Texas y Nuevo México hasta el sureste de Arizona en Estados Unidos; y en México se ha registrado en Chihuahua, Coahuila, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (**Figura 2**) (Martínez, 1989; Villaseñor y Espinosa, 1998).

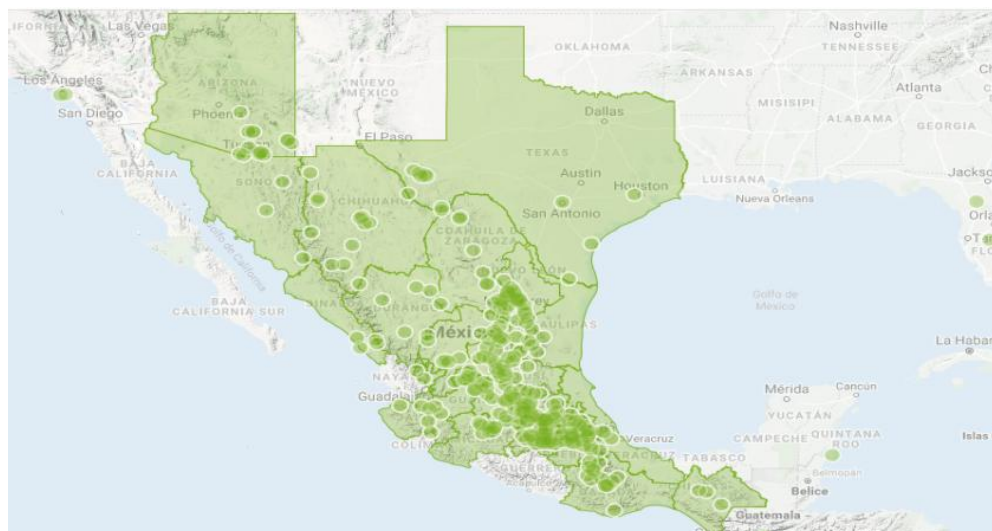


Figura 2. Distribución geográfica de *Bouvardia ternifolia* en México y Estados Unidos (CONABIO, 2019).



2.3.4 Hábitat

Preferentemente en bosques de pino-encino, matorrales y pastizales xerófilos, tanto en hábitats desérticos y montañosos de los 800 a 3000 msnm, sobre todo en lugares perturbados, a orillas de caminos y carreteras (Villaseñor y Espinosa, 1998).

2.3.5 Nombres comunes

En México recibe su nombre dependiendo del estado en donde se encuentre: Hierba del pasmo, hierba del indio (Sinaloa), doncellita (Oaxaca), tabaquillo (Michoacán), trompetilla, mirto (Coahuila y Durango), trompetilla, contrahierba, tlacoxóchitl (náhuatl, Estado de México), nucopuetel (otomí, Puebla), candelilla (Hidalgo) y doto (otomí, Querétaro) (Martínez, 1979).



Figura 3. *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schlecht. (Rubiaceae).

2.3.6 Usos

En la medicina tradicional se utilizan las partes aéreas de la planta (tallos, hojas y flores) generalmente en infusión. Se le atribuyen propiedades curativas para aliviar la disentería y la rabia, como remedio para la tos y contra los cólicos, también es utilizada como sedante, analgésica y antiespasmódica, para el tratamiento de mordeduras de víboras, picaduras de abeja, alacrán, arañas, hormigas y ciempiés.



Se dice que los antiguos indígenas, para sangrar, provocaban una hemorragia nasal con el polvo de la cebadilla (*Stenantium frigidum*), y para detenerla absorbían el polvo de la raíz de la *Bouvardia ternifolia* (Martínez, 1989; Argueta-Villamar et al., 1994).

Estudios científicos han comprobado las actividades de esta planta tales como antiinflamatoria, antioxidante, anti-acetilcolinesterasa, antitumoral, citotóxica y contra el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, y recientemente su actividad antidiabética (Jolad et al., 1977; Zalacaín et al., 1982; Pérez-Gutiérrez et al., 1998; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Jiménez-Ferrer et al., 2005; García-Morales et al., 2015).

2.3.7 Composición química

Se han aislado de *B. ternifolia* compuestos que se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Principales metabolitos secundarios aislados de *B. ternifolia*.

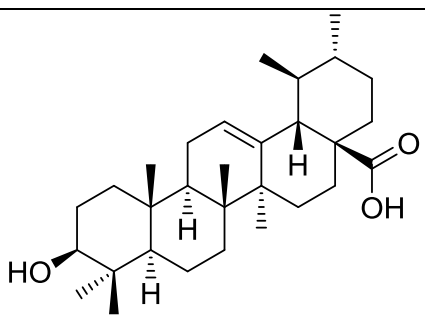
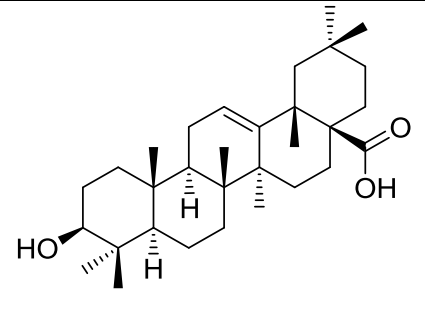
| Triterpenoides | | |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Nombre | Estructura | Referencia |
| Ácido ursólico (1) |  | (Herrera-Ruíz et al., 2012; García-Morales et al., 2015). |
| Ácido oleanólico (2) |  | (García-Morales et al., 2015). |

Tabla 2. Principales metabolitos secundarios aislados de *B. ternifolia* (cont.)

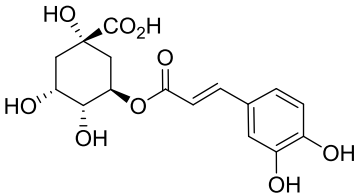
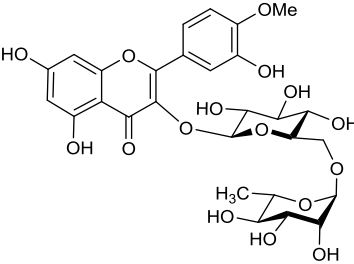
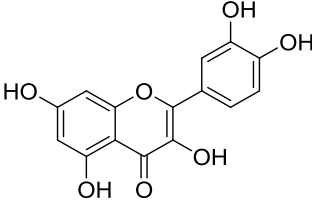
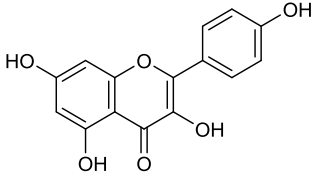
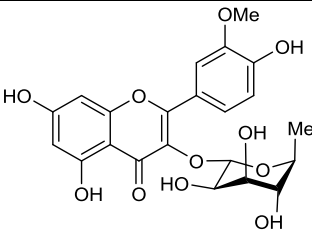
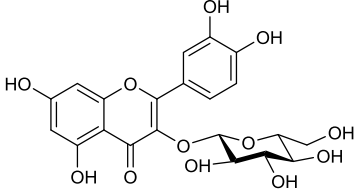
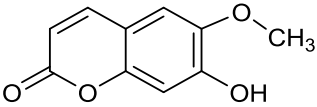
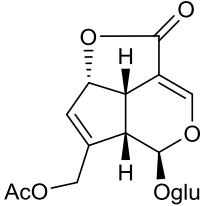
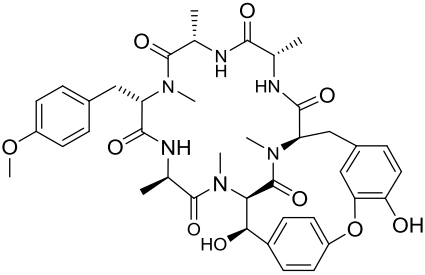
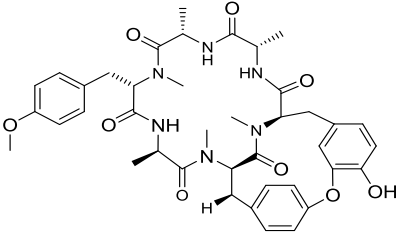
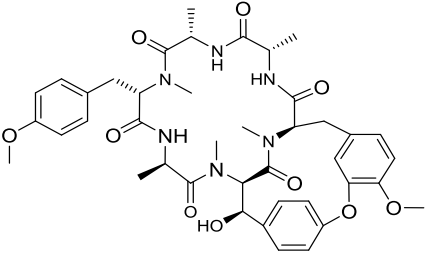
| Éster de polifenol | | |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Ácido clorogénico (3) |  | (García-Morales et al., 2015). |
| Flavonoides | | |
| Rutina (4) |  | (Herrera-Ruíz et al., 2012; García-Morales et al., 2015) |
| Quercetina (5) |  | (Herrera-Ruíz et al., 2012) |
| Kaempferol (6) |  | (Herrera-Ruíz et al., 2012) |
| 3-O-ramnopiranosido de quercetina (7) |  | (García-Morales et al., 2015) |
| 3-O-glucopiranosido de quercetina (8) |  | (García-Morales et al., 2015) |

Tabla 2. Principales metabolitos secundarios aislados de *B. ternifolia* (cont.)

| Cumarinas | | |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Escopoletina (9) |  | (García-Morales et al., 2015) |
| Iridoide monoterpénico | | |
| Asperulósido (10) |  | (Cruz, 2017) |
| Péptidos | | |
| Bouvardina (11) |  | (Jolad et al., 1977; Bates et al., 1983) |
| Deoxibouvardina (12) |  | (Jolad et al., 1977; Bates et al., 1983) |
| 6-O-Metilbouvardina (13) |  | (Bates et al., 1983) |



2.3.8 Antecedentes farmacológicos

Se han realizado diferentes estudios farmacológicos a la especie *Bouvardia ternifolia*, lo que ha permitido corroborar experimentalmente algunas de las propiedades medicinales que se le atribuyen a esta especie vegetal.

2.3.8.1 Actividad antitumoral y citotóxica

La bouvardina y deoxibouvardina obtenidos del extracto metanólico de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *Bouvardia ternifolia* presentan una actividad antitumoral importante hacia la línea celular de la leucemia linfocítica P388 (PS) y melanoma melanocítica B16 (B1), también presenta actividad citotóxica contra adenocarcinoma nasofaríngeo (KB) (Jolad et al., 1977; Zalacaín et al., 1982).

2.3.8.2 Actividad hipoglucemiante

Los triterpenoides (ácidos ursólico y oleanólico) provenientes de una fracción activa de la separación cromatográfica del extracto de cloroformo de *B. ternifolia*, se evaluaron como posibles agentes hipoglucemiantes y/o antihiper glucémicos. Los dos ácidos fueron administrados independientemente vía i.p. a diferentes dosis (25, 50, 75 mg/kg) a ratones macho cepa CD1 (25-30 g), los cuales se dividieron en normoglucémicos y diabetizados (inducido por la administración de aloxano monohidratado 70 mg/kg vía i.v.). Ambos compuestos redujeron los niveles de glucosa en sangre y en modo dependiente de la dosis. En ratones diabetizados, el ácido ursólico ejerció la máxima respuesta de -66.35% a las 4.5 h (75 mg/kg).

Los resultados se compararon con los de otro grupo de ratones tratados con tolbutamida (75 mg/kg), en las mismas condiciones mencionadas anteriormente obteniéndose los mismos resultados que con el ácido ursólico (-61.25% vs -63.7% de tolbutamida). Con el ácido oleanólico el máximo efecto antihiper glucémico fue de -52.23%, 4.5 h después de la administración del compuesto. Este efecto persistió por un periodo mayor a 24 h. La administración de ácido ursólico a ratones normoglucémicos (25 mg/kg) produjo un descenso estadísticamente significativo de glucosa en sangre a las 1.5 h (-6.75%) y la máxima reducción de azúcar en sangre a las 4.5 h a dosis de 75 mg/kg (-36.52%). Usando idénticas



cantidades de ácido ursólico y tolbutamida (75 mg/kg) se obtuvo la máxima reducción de azúcar en sangre (-29.86% para ácido ursólico y -31.3% para tolbutamida) a las 4.5 h. Los resultados obtenidos con el ácido oleanólico fueron también similares comparados con los de tolbutamida (Pérez-Gutiérrez et al., 1998b).

Las suspensiones acuosas de los extractos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a diferentes concentraciones. El extracto clorofórmico de las hojas de *B. ternifolia* presenta una actividad hipoglucemiante importante; estudios *in vivo*, en ratones diabéticos, mostraron una reducción de hasta un 58.56 % de los niveles de glucosa en sangre, a las 4.5 h, persistiendo aún a las 24 h. El efecto de este extracto se comparó con el de la tolbutamida, resultando la actividad hipoglucemiante del extracto similar a la de ésta (Pérez-Gutiérrez et al., 1998a).

2.3.8.3 Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antiacetilcolinesterasa

Estudios *in vivo*, mediante un modelo experimental de edema en oreja de ratón inducido por el 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), mostraron que el extracto de EtOH y la fracción de AcOEt (obtenida a partir del extracto de etanol, por reparto con acetato de etilo:agua) muestran un efecto antiinflamatorio significativo reduciendo la inflamación arriba del 70 % a las 4 horas de la administración, al compararse con un control tratado con dexametasona (García-Morales et al., 2015).

La evaluación de la actividad antioxidante del extracto de EtOH y la fracción de acetato de etilo (obtenida a partir del extracto etanólico, por reparto con acetato de etilo:agua) de la especie *B. ternifolia*, se ensayó mediante la peroxidación lipídica en homogenados de cerebro de ratón, cuantificando el contenido de TBARS (García-Morales et al., 2015).

Los resultados finales revelaron que tanto el extracto de EtOH como la fracción de AcOEt poseen actividad antioxidante importante a concentraciones de 100 µg/mL, con una CI_{50} de 356.21 ± 22.89 µg/mL y 42.66 ± 0.93 µg/mL respectivamente (García-Morales et al., 2015).



La actividad anti-acetilcolinesterasa del extracto de EtOH de *B. ternifolia* se evaluó mediante técnicas espectrofotométricas siguiendo el método descrito por Ellman y cols. (1961), utilizando acetilcolinesterasa del homogenado de cerebro de rata y yoduro de acetilcolina como sustrato. El extracto hidroalcohólico (etanol 60%) y la fracción de acetato de etilo inhibieron $12.26 \pm 2.53\%$ y $13.82 \pm 2.04\%$ respectivamente, mostrando una inhibición significativa de la enzima acetilcolinesterasa cuando se comparó con el control sin inhibidor (García-Morales, 2015).

2.3.8.4 Actividad antagonista contra el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*

La pancreatitis aguda se caracteriza por un edema masivo del páncreas y los tejidos retroperitoneales adyacentes, el edema es el resultado de un aumento de la permeabilidad vascular del líquido plasmático. El patrón clínico de envenenamiento por una picadura de escorpión de *C. limpidus limpidus* incluye diversas manifestaciones asociadas con pancreatitis aguda, como dolor de epigastrio y vómitos, que, cuando están presentes, se consideran síntomas graves. Hace un tiempo se demostró que las toxinas de los escorpiones del género *Tityus* poseen un poderoso efecto secretagogo en el páncreas. Sin embargo, no hay evidencia experimental que muestre que el veneno de escorpión *C. limpidus limpidus* provoque una inflamación aguda del páncreas (García-Morales et al., 2015).

De acuerdo a un estudio previo realizado por Jiménez-Ferrer y colaboradores (1999), se demostró que el extracto de metanol obtenido de raíces de *Bouvardia ternifolia* es capaz de disminuir la letalidad del veneno de *C. limpidus limpidus* en ratones (Jiménez-Ferrer et al., 2005).

Por otro lado, para evaluar la acción antagonista contra el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* de los extractos de metanol y de hexano de raíces de *B. ternifolia*, Jiménez-Ferrer y colaboradores (2005) realizaron un estudio en ratas. Los resultados finales revelaron que *C. limpidus limpidus* posee un efecto secretagogo de la amilasa en el páncreas de los ratones, que se antagoniza



eficazmente con los extractos de hexano y metanol, desplazando la CE_{50} del veneno en la liberación de amilasa de 3.76×10^{-3} mg/mL a una CE_{50} de 9.3×10^{-3} mg/mL y 0.01629×10^{-1} mg/mL respectivamente (Jiménez-Ferrer et al., 2005).

2.4 Diabetes mellitus (DM)

La diabetes es una enfermedad sistémica que provoca trastornos crónicos-degenerativos, asociados al efecto de hiperglucemia crónica. El desorden metabólico es de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales. La hiperglucemia crónica se debe a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, afectando directamente el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (NOM-015-SSA2-2010).

Existen varios tipos de diabetes pero los más reconocidos son el Tipo 1 (DM1) y el Tipo 2 (DM2) siendo el Tipo 2 el más prevaleciente en el mundo. La DM1, denominada anteriormente como diabetes insulino dependiente o juvenil, se caracteriza por hipoglucemia causada por la destrucción de las células beta del páncreas, resultando en la ausencia de síntesis de insulina, hormona producida en este órgano. Dentro del cuadro clínico los síntomas característicos de la DM1 son poliuria, polidipsia, polifagia y disminución del peso (NOM-015-SSA2-2010; OMS, 2019).

La DM2 es la más común, se estima que alrededor del 90% de las personas que padecen diabetes mellitus poseen esta variedad. Los individuos que sufren este tipo de diabetes tienen un defecto en la secreción de insulina, generalmente acompañado de la resistencia a esta hormona, aumentando los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia).

La DM2 es considerada como uno de los problemas de salud pública a nivel mundial más importantes, llegando a considerarse como una epidemia en el mundo, ya que provoca complicaciones en muchas partes del organismo como ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputaciones de miembros inferiores y daños neurológicos, lo que resulta en la



discapacidad y el incremento del riesgo de muerte prematura de los afectados (OMS 2019, IDF).

Tan solo en México se estima que 11.5 millones de personas padecen DM2, ocupando el segundo lugar en número de defunciones al año. Datos reportados por la International Diabetes Federation (IDF) hasta el año 2017 cerca de 425 millones de personas padecen diabetes a nivel mundial y se estima que para el año 2045 las cifras crezcan a 629 millones de personas (**Figura 4**).

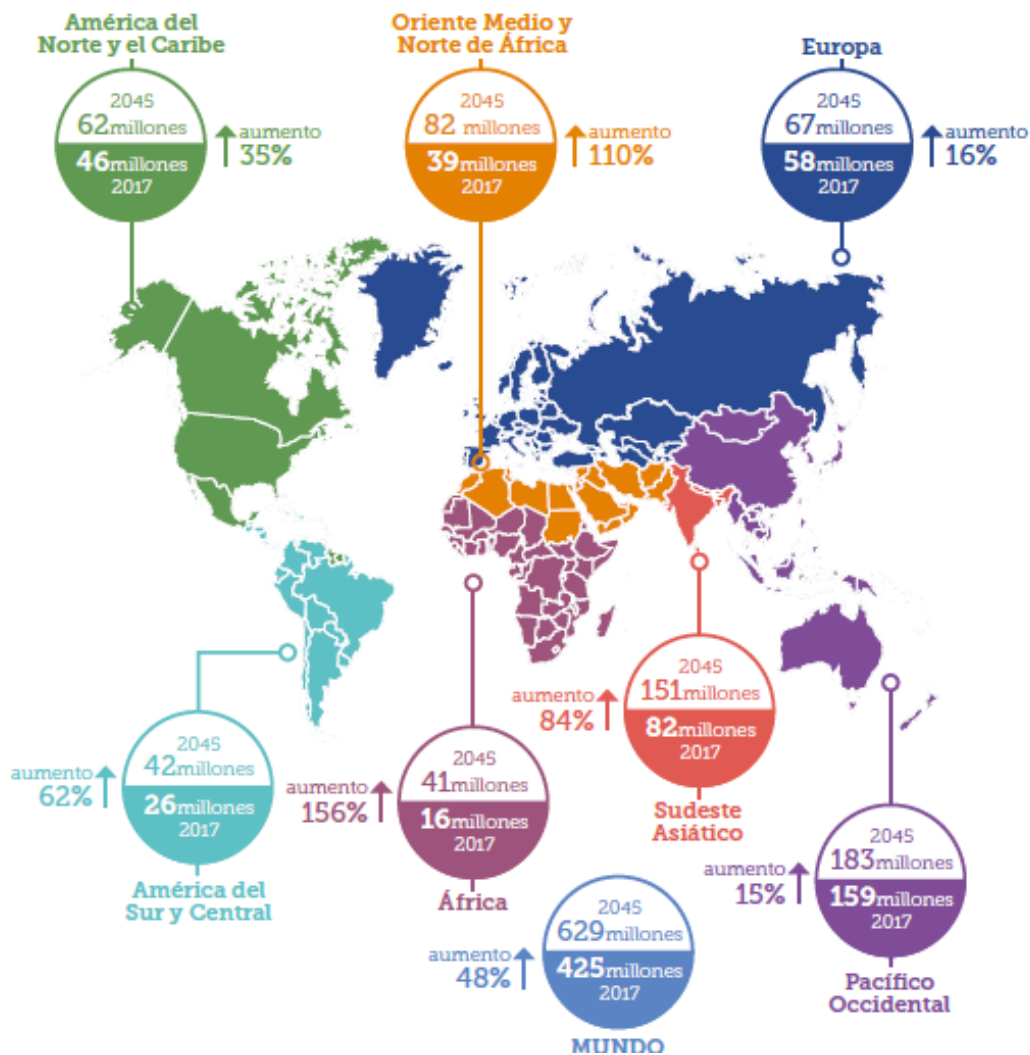


Figura 4. Número de personas con DM2 en el mundo (IDF Atlas 8 ed. 2017).



2.4.1 Tratamiento de la diabetes mellitus

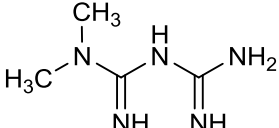
En el tratamiento de la diabetes se siguen diversas estrategias, que tienen como finalidad disminuir los niveles de glucosa en sangre y mantenerlos dentro de los parámetros normales, así como mantener el control metabólico, aliviar los síntomas, prevenir complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y disminuir la tasa de mortalidad de esta enfermedad (NOM-015-SSA2-2010).

Inicialmente el tratamiento para la diabetes era basado en una terapia dietética y se combinaba con actividad física de ser posible, actualmente existen diversas terapias farmacológicas que involucran la dieta, el control de peso y la actividad física, obteniendo mejores resultados para el control de este padecimiento.

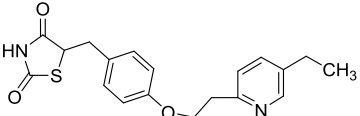
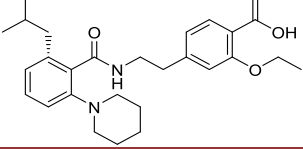
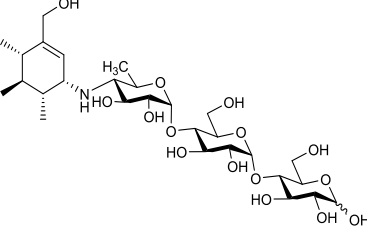
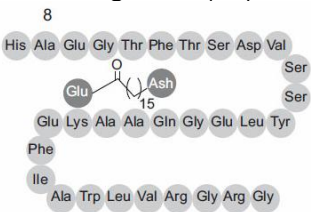
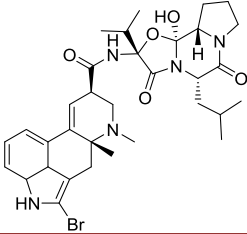
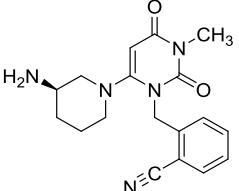
Las terapias utilizadas para el control de hiperglucemia se clasifican en tres grupos según la respuesta fisiológica por la cual intervienen para el control de este padecimiento (**Tabla 3**) (Israili, 2011):

- 1.- Fármacos que promueven la secreción de insulina, comúnmente llamados agentes secretagogos (Ej. Las sulfonilureas).
- 2.- Fármacos sensibilizadores a la acción de la insulina, es decir, favorecen la acción de la insulina en músculo, tejido adiposo, hígado y cerebro. (Ej. biguanidas y tiazolidindionas).
- 3.- Fármacos inhibidores de α -glucosidasas. Estos reducen la tasa de absorción de carbohidratos en el tracto intestinal mediante la inhibición de enzimas α -glucosidasas (Ej. acarbosa).

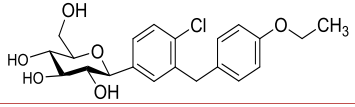
Tabla 3. Principales agentes utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus (ADA, 2019).

| Agente | Ejemplo | Sitio de acción | Mecanismo de acción |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|
| Biguanidas | Metformina (14)  | Hígado | Disminuye la producción de glucosa hepática |
| | Sulfonilureas | | |

**Tabla 3.** Principales agentes utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus (Cont.).

| Agente | Ejemplo | Sitio de acción | Mecanismo de acción |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tiazolidindionas | <p>Pioglitazona (16)</p>  | Músculo | Aumenta la sensibilidad de insulina |
| Meglitinidas | <p>Repaglinida (17)</p>  | Páncreas | Aumentan la secreción de insulina y mejor control de glucemia |
| Inhibidores de α-glucosidasas | <p>Acarbosa (18)</p>  | Intestino | Inhiben las α -glucosidasas intestinales |
| Agonista de receptores GLP1 | <p>Liraglutida (19)</p>  | Intestino y páncreas | Aumentan la secreción de insulina |
| Agonistas de la dopamina | <p>Bromocriptina (20)</p>  | Receptores dopaminérgicos (SNC) | Modulan la regulación hipotalámica del metabolismo Aumentan la sensibilidad de la insulina |
| Inhibidores de DPP-4 | <p>Alogliptina (21)</p>  | Intestino | Inhiben selectivamente la enzima dipeptidil peptidasa de tipo 4 (DPP-4), implicado en la inactivación de hormonas incretinas |

**Tabla 3.** Principales agentes utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus (Cont.).

| Agente | Ejemplo | Sitio de acción | Mecanismo de acción |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Inhibidores de SLGT-2 | Dapagliflozina (22)  | Riñón | inhibir la reabsorción de glucosa en los túbulos proximales del riñón |
| Análogos de amilina | Pramlintida (23) H-Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH ₂ | Receptores de amilina | Disminuyen la secreción de glucagon Retrasa el vaciado gástrico |

2.4.2 Plantas medicinales con propiedades antidiabéticas

A lo largo de la historia se han utilizado diferentes remedios y fármacos para el tratamiento de la DM2, de hecho, desde la edad media se han prescrito plantas para este padecimiento, tal es el caso de *Galega officinalis* L. (Fabaceae).

Aunque las terapias alopáticas siguen siendo las más importantes para el manejo inicial del tratamiento de la diabetes, los remedios a base de hierbas han ganado una amplia aceptación para tratar esta condición. Estas terapias alternativas son particularmente valoradas en países como México, con gran acervo de plantas medicinales fuertemente vinculadas a los valores culturales de la población. Entre las especies de plantas utilizadas para tratar la diabetes en México, solo 38 han sido analizadas por su actividad inhibitoria de α -glucosidasas (Mata et al., 2013).

La medicina tradicional (herbolaria) empleada para el tratamiento de la diabetes es de particular importancia en los países en desarrollo donde el costo de los medicamentos convencionales es una carga para la población. A pesar de la introducción de agentes hipoglucemiantes de fuentes naturales y sintéticas, la diabetes y sus complicaciones secundarias continúan siendo un problema médico importante.



Una de las grandes ventajas de las plantas medicinales es que son de fácil disposición, son consideradas menos tóxicas y también (aunque no del todo cierto), tienen menos efectos secundarios que los medicamentos alopáticos.

La información etnobotánica informa la existencia de alrededor de 800 plantas que pueden poseer un potencial antidiabético (**Tabla 4**), demostrado cuando se evaluaron utilizando técnicas experimentales actualmente disponibles (Arumugam et al. 2013; Mata et al., 2013; Ríos et al., 2015). Por otra parte, se ha informado que los fitoconstituyentes aislados de una gran variedad de plantas retienen la capacidad regenerativa de las células β -pancreáticas, la promoción de secreción de insulina, ayudando en la lucha contra el problema de la resistencia a la insulina. Por todo lo anterior, los fitoconstituyentes identificados a partir de plantas medicinales utilizadas tradicionalmente pueden eventualmente emplearse para desarrollar nuevos tipos de terapias eficaces para el control de la diabetes mellitus tipo 2 (Bhagour et al. 2016).

Tabla 4. Ejemplos de plantas con propiedades antidiabéticas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005)

| Especie vegetal | Familia | Nombre común | Parte utilizada |
|------------------------------------------------|------------------|---------------------|------------------------|
| <i>Abutilon trisulcatum</i> | Malvaceae | Tronadora | Hojas |
| <i>Acourtia thurberi</i> | Asteraceae | Matarique | Partes aéreas |
| <i>Acrocomia mexicana</i> | Arecaceae | Coyol | Raíz |
| <i>Bauhinia divaricata</i> L. | Fabaceae | Pata de vaca | Hojas y flores |
| <i>Bocconia arborea</i> S. | Papaveraceae | Llora sangre | Hojas |
| <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) Schltdl. | Rubiaceae | Trompetilla | Hojas y tallos |
| <i>Brickellia cavanillesii</i> (Cass.) | Asteraceae | Prodigiosa | Partes aéreas |
| <i>Bursera simaruba</i> (L.) | Burseraceae | Cuajote | Corteza |
| <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) | Malpighiaceae | Nanche | Frutos y corteza |
| <i>Calamintha macrostema</i> | Lamiaceae | Tabaquillo | Raíz |
| <i>Capraria biflora</i> L. | Scrophulariaceae | Sabadilla | Hojas |
| <i>Cassia skinneri</i> Benth | Fabaceae | Frijolillo | Hojas |

**Tabla 4.** Ejemplo de plantas con propiedades antidiabéticas (Cont.)

| Especie vegetal | Familia | Nombre común | Parte utilizada |
|---------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------|
| <i>Castilleja Mutis</i> ex L. f. | Scrophulariaceae | Hierba del gato | Partes aéreas |
| <i>Cirsium mexicanum</i> DC | Asteraceae | Cardo santo | Raíz |
| <i>Cnidoscopus aconitifolius</i> (Mill.) I.M. Johnst | Euphorbiaceae | Chaya | Hojas |
| <i>Cnidoscopus multilobus</i> (Pax) I.M. Johnst | Euphorbiaceae | Mala mujer | Hojas |
| <i>Coix lacryma-jobi</i> L. | Poaceae | Lágrima de San Pedro | Partes aéreas |
| <i>Dorstenia contrajerva</i> L. | Moraceae | Contrayerba | Hojas |
| <i>Elaphoglossum</i> sp. Schott ex J. Sm | Lomariopsidaceae | Hierba del pastor | Partes aéreas |
| <i>Equisetum hyemale</i> L. | Equisetaceae | Cola de caballo | Partes aéreas |
| <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl | Rosaceae | Níspero | Hojas y flores |
| <i>Eysenhardtia polystachya</i> (Ortega) Sarg. | Fabaceae | Palo dulce | Partes aéreas y corteza |
| <i>Foeniculum vulgare</i> Mill | Apiaceae | Hinojo | Partes aéreas |
| <i>Guaiacum sanctum</i> L | Zygophyllaceae | Guayacan | Corteza |
| <i>Heterotheca inuloides</i> Cass. | Asteraceae | Amica | Hojas |
| <i>Hintonia latiflora</i> (Sesse & Moc. ex DC.) Bullock | Rubiaceae | Copalquin, cáscara sagrada. | Corteza |
| <i>Ipomoea stans</i> Cav. | Convolvulaceae | Tumba vaquero | Partes aéreas |
| <i>Juliania adstringens</i> (Schltdl.) Schltdl | Julianiaceae | Cuachalalate | Corteza |
| <i>Justicia spicigera</i> Scheltdl | Acanthaceae | Muicle | Hojas |
| <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers. | Crassulaceae | Tronador | Partes aéreas |
| <i>Larrea tridentata</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Coville | Zygophyllaceae | Gobernadora | Partes aéreas |
| <i>Loeselia coccinea</i> (Cav.) G. Don | Polemoniaceae | Hoja de la virgen | Hojas |
| <i>Valeriana procera</i> Kunth | Valerianaceae | Valeriana | Raíz |



2.4.3 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

Las α -glucosidasas pertenecen a la familia de las enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico de carbohidratos complejos (oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos) liberando glucosa y otros monosacáridos en el borde del cepillo del intestino delgado (Israili, 2011).

Las α -glucosidasas se encuentran en la luz del intestino delgado sobre la membrana de los enterocitos (**Figura 5**), lugar donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos. Este tipo de enzimas también puede romper enlaces O-, N-, S-glicosilados. La inhibición de estas enzimas reduce la tasa de digestión de carbohidratos, bloqueando así el aumento repentino de glucosa, lo que resulta en una disminución de la hiperglucemia posprandial (Borges de Melo et al. 2006; Aoki et al., 2019).

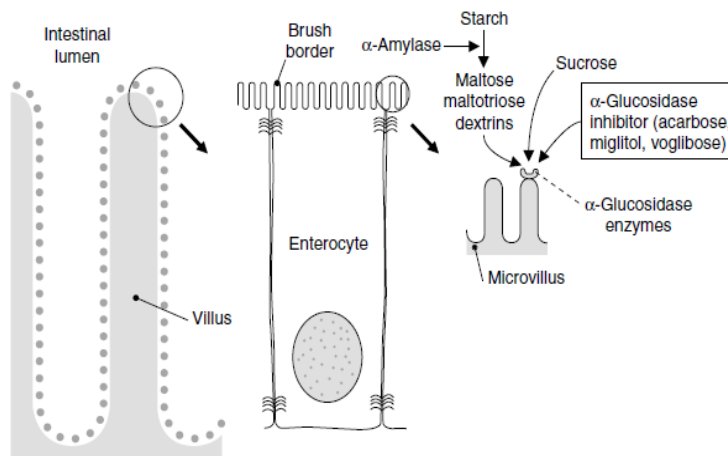


Figura 5. Ubicación de las enzimas α -glucosidasas (Krentz et al., 2005).

Las α -glucosidasas provienen de varias fuentes y difieren en el reconocimiento de su sustrato, lo cual permite dividir las en cuatro grupos I-IV. Las α -glucosidasa de tipo I se encuentran en bacterias, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e insectos, mostrando mayor afinidad hacia sustratos heterogéneos como sacarosa y *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) y baja actividad hacia los oligosacáridos de maltosa y sustratos de almidón, lo que muestra que estas enzimas reconocen estructura de glucosa presente en sus sustratos.



Las enzimas de tipo II se encuentran en organismos fúngicos, e hidrolizan preferentemente a los sustratos homogéneos y poliméricos, poseen baja actividad hacia sustratos heterogéneos. Las enzimas tipo III se encuentran en plantas y animales, casi no muestran actividad hacia sustratos heterogéneos y muestran una alta actividad hacia sustratos homogéneos y poliméricos como maltosa y α -glucanos (incluyendo el almidón y el glucógeno). Las enzimas de tipo IV se aíslan de bacterias y muestran mayor afinidad por sustratos homogéneos como maltosa (Chiba, 1997; Israili, 2012; Moorthy et al., 2012)

Los inhibidores de α -glucosidasas son utilizados ampliamente como fármacos de primera línea para el tratamiento de la DM2 recién diagnosticada y que no puede ser tratada de manera adecuada solo con dieta y ejercicio, debido a su modo de acción único para controlar la liberación de glucosa de los carbohidratos complejos y los disacáridos. Los inhibidores de la α -glucosidasa también se pueden usar en combinación con una sulfonilurea, insulina o metformina (Derosa y Maffioli, 2012).

Los inhibidores de α -glucosidasas mejor conocidos y que se han utilizado ampliamente para el tratamiento de pacientes con DM2 son: la acarbosa, el miglitol y la voglibosa. Estos agentes son más efectivos para disminuir la hiperglucemia posprandial y deben evitarse en pacientes con insuficiencia renal significativa (Olokoba et al., 2012; Wu et al., 2014).

La acarbosa (**Figura 6**) disminuye la incidencia de eventos cardiovasculares y previene la progresión de la diabetes en individuos con tolerancia a la glucosa (IGT), puede reducir el peso corporal, mejorar la presión arterial y atenuar la hipertrigliceridemia en ayunas y posprandial. Estas acciones la convierten en una opción útil para el manejo del síndrome metabólico y la pre-diabetes (Kalra, 2014; Aoki et al., 2019).

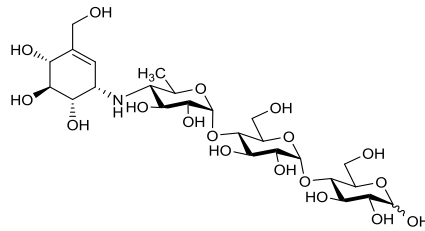


Figura 6. Estructura de la acarbosa.

El miglitol (**Figura 7**) reduce los niveles séricos de insulina, se recomienda en monoterapia o terapia combinada con una sulfonilurea, metformina o insulina. La voglibosa (**Figura 7**) también reduce el desarrollo de la diabetes tipo 2 en individuos con IGT. Tanto el miglitol como la voglibosa son notablemente efectivos para la hiperglucemia posprandial (Aoki et al., 2019).

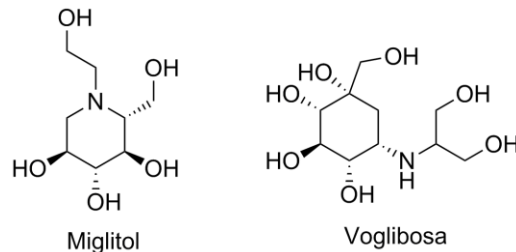


Figura 7. Estructura del miglitol y la voglibosa.

2.4.4 Inhibidores de α -glucosidasas obtenidos a partir de plantas medicinales

Debido al incremento drástico de casos diagnosticados con diabetes a nivel mundial y las estadísticas alarmantes que revelan a esta enfermedad como una pandemia, se ha visto la necesidad de la búsqueda de moléculas activas de diversas fuentes naturales, en su gran mayoría plantas medicinales, ya que estas pueden proporcionar una diversidad química de compuestos eficaces para tratar la diabetes mellitus (Benalla et al., 2010).

Las investigaciones farmacológicas muestran la importancia de las plantas medicinales y de otras fuentes naturales como fuentes preciadas de una gran diversidad de moléculas activas como inhibidores de α -glucosidasas. El descubrimiento de estos compuestos como precursores para la síntesis de



fármacos antidiabéticos, ha sido de gran importancia ya que algunos de ellos han conducido al descubrimiento de fármacos más efectivos. Muchos inhibidores de las α -glucosidasas encontrados son fitoconstituyentes de naturaleza química muy variada (**Tabla 5**), como: flavonoides, alcaloides, terpenoides, antocianinas y compuestos glicosídicos y fenólicos, entre otros (Mata et al., 2013).

Tabla 5. Constituyentes fitoterapéuticos con actividad inhibitoria de α -glucosidasas obtenidos de productos naturales (Kumar et al. 2011; Mata et al., 2013).

| Planta | Parte | Constituyente |
|---------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Adhatoda vasica</i> Nees (Acanthaceae) | Hojas | Vasicina Vasicinol |
| <i>Alstonia scholaris</i> (Apocynaceae) | Hojas | 3-O- β -D-glucopiranosido de quercetina |
| <i>Brickellia cavanillesii</i> (Cass.) A. Gray | Partes aéreas | Isoramnetina Caleína C |
| <i>Bergenia ciliate</i> (Saxifragaceae) | Rizoma | (-)-3-O-galoilepicatequina |
| <i>Commelina communis</i> (Commelinaceae) | Partes aéreas | Isoquercitrina |
| <i>Crataegus oxyacantha</i> (Rosaceae) | Hojas | Apigenina Vitexina |
| <i>Derris indica</i> (Fabaceae) | Raíces | Karajin Pongamol |
| <i>Derris scandens</i> (Fabaceae) | Raíces | 4, 5, 7-trihidroxibiprenilisoflavona |
| <i>Fagara tessmannii</i> (Rutaceae) | Corteza del tallo | Ácido vanílico 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona |
| <i>Machilus philippinensis</i> (Lauraceae) | Hojas | 3-O-ramnopiranosido de quercetina 3-O-ramnopiranosido de kaempferol |
| <i>Scutellaria baicalensis</i> (Lauraceae) | Raíces | Baicaleína |



3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente un 80 % de la población mundial depende de las plantas para su atención primaria de salud en los países en desarrollo. En México dada la riqueza y variedad de su flora medicinal, es necesario el estudio científico de especies que han sido empleadas tradicionalmente con fines terapéuticos para garantizar su calidad, seguridad y eficacia. A este respecto, existe información de uso de especies vegetales para el tratamiento de la diabetes, pero no todas cuentan con un respaldo científico que corrobore dicha actividad.

En la medicina tradicional mexicana la “trompetilla” es una planta usada, entre otros, para contrarrestar piquetes de alacranes. Un estudio etnobotánico actual realizado por Andrade-Cetto y cols. (2005) indicó el uso de este vegetal para el tratamiento de diabetes y en la literatura científica existen algunos reportes a este respecto, sobre estudios de actividad antihiperlipémica en ratones. Dado el amplio uso en la medicina tradicional mexicana de la trompetilla, es pertinente asentar datos de estudio científico dentro de una monografía de la planta que recabe datos de calidad, seguridad y eficacia, para a futuro integrarse dentro de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

Debido al incremento de casos registrados de prevalencia y los casos de mortalidad en todo el mundo, la búsqueda de compuestos de origen natural que sirvan como pioneros estructurales de nuevos fármacos que inhiban las enzimas α -glucosidasas ha cobrado gran importancia.

Con la realización del presente proyecto se pretende contribuir dentro de un área de investigación sobre *B. ternifolia*, relacionada con pruebas preliminares *in vitro* de eficacia terapéutica en diabetes tales como la actividad de los extractos y compuestos aislados en el modelo de inhibición enzimática de α -glucosidasas.



4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

Si en la medicina tradicional mexicana se describe que *Bouvardia ternifolia* “trompetilla” es una planta con efecto antidiabético, entonces se espera que sus preparados y al menos uno de sus compuestos presenten resultados de actividad en un modelo enzimático de diabetes apropiado.

4.2 Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto es evaluar el efecto de la infusión de la especie *Bouvardia ternifolia* L. (Rubiaceae) y de sus metabolitos principales sobre enzimas α -glucosidasas como prueba preliminar de eficacia terapéutica para integrar el resultado dentro de una monografía científica de la planta.

4.3 Objetivos particulares

- Colecta y determinación botánica de la planta en estudio (*B. ternifolia*)
- Obtención de la infusión de las partes aéreas.
- Obtención de las fracciones y metabolitos secundarios de acetato de etilo y *n*-butanol (por reparto de la infusión).
- Determinación de la actividad inhibitoria hacia las enzimas α -glucosidasas.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material y equipo utilizado

Para el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizaron placas cromatográficas mediante técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas de Silica gel 0.25mm de grosor (Silica gel 60 F₂₅₄ Merck®) y empleando diferentes sistemas de elución. Como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en H_2SO_4 2N. Las visualizaciones de las placas se realizó en una lámpara de UV UVLMS-38 EL Series 3UV Lamp UVP visualizando a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

La separación y purificación de los compuestos se realizó en una columna de vidrio abierta, utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron registrados a 400 MHz, en espectrómetros de alta resolución Varian Unity Inova, utilizando como disolvente CD_3OD .

Los espectros de HPLC-MS se obtuvieron en un cromatógrafo marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series equipado con una columna capilar Extend-C18, con dimensiones de 4.6 mm x 150 mm x 5 μm , acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies, modelo 6410 Triple Quad LC/MS, utilizando el método de ionización por electrospray a 135 V.

En la determinación de fenoles y flavonoides totales se utilizó un espectrofotómetro Epoch (Biotech) UV-Vis para la lectura de microplacas.

5.2 Material vegetal

Las partes aéreas (tallos, hojas y semillas) de la especie vegetal *Bouvardia ternifolia* Schltldl fueron colectadas en Atotonilco el grande, Hidalgo, ubicación geográfica que corresponde a las coordenadas 29°17.594 N, 98°40.339 O coordenadas en UTM. La planta fue determinada botánicamente por el M. en C. R. Ríos-Gómez.



5.2.1 Preparación del extracto acuoso de *B. ternifolia*

El material vegetal se desecó a temperatura ambiente y al aire libre dentro de un periodo de 15 días, posteriormente se fragmentó utilizando un molino de cuchillas Thomas Wiley Modelo 4.

La infusión se preparó a partir de 271.2 g del material vegetal previamente molido, tratando el material vegetal con agua a ebullición (92°C); la mezcla se dejó reposar durante treinta minutos y transcurrido ese tiempo se filtró (950 mL).

5.2.2 Fraccionamiento por reparto con AcOEt del extracto acuoso de *B. ternifolia*

El producto de la infusión se sometió a un proceso de fraccionamiento mediante la técnica de reparto de manera exhaustiva, utilizando como disolvente AcOEt. La fracción orgánica se concentró a presión reducida en rotavapor y se obtuvieron 0.6361 g de fracción de AcOEt.

5.2.3 Fraccionamiento secundario del extracto acuoso de *B. ternifolia* (*n*-butanol)

La fracción acuosa remanente de la extracción con AcOEt se sometió a un segundo fraccionamiento mediante la técnica de reparto de manera exhaustiva, utilizando *n*-butanol como disolvente. El proceso se repitió por triplicado para finalmente después de concentrar al vacío; resultar 1.56 g de la fracción de *n*-butanol. De ésta, una parte fue soluble en MeOH y otra insoluble la cual se disolvió con acetona, obteniéndose así una fracción de metanol (FI-M, 1.18 g) y una fracción soluble en acetona (FI-A, 0.38 g).

5.2.4 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción orgánica de AcOEt de la infusión de *B. ternifolia*

La fracción orgánica de AcOEt obtenida a partir de la infusión de *B. ternifolia* se sometió a un proceso de fraccionamiento usando la técnica de cromatografía en columna abierta, empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y CH₃OH como fase móvil. Se colectaron 27 fracciones las cuales se analizaron por CCD empleando los sistemas de disolventes descritos en la **Tabla 6** y por su similitud cromatográfica se reunieron en once fracciones primarias (Btae-1-Btae-11).

**Tabla 6.** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de AcOEt

| Sistema de elución | Fracciones recolectadas | Clave |
|----------------------------------|-------------------------|---------|
| Diclorometano/Acetona (80/20) | 1-2 | Btae-1 |
| | 3-4 | Btae-2 |
| | 5-6 | Btae-3 |
| | 7 | Btae-4 |
| Diclorometano/Metanol (80/20) | 8-9 | Btae-5 |
| | 10-11 | Btae-6 |
| | 12-14 | Btae-7 |
| | 15-19 | Btae-8 |
| | 20 | Btae-9 |
| | 21-23 | Btae-10 |
| | 24-26 | Btae-11 |

5.2.5 Fraccionamiento de la fracción FI-M de *n*-butanol de la infusión de *B. ternifolia*

La fracción FI-M (parte soluble en metanol) se sometió a un proceso de fraccionamiento usando la técnica de CCA, empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y CH₃OH como fase móvil. Se colectaron 31 fracciones las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica con los sistemas de disolventes descritos en la **Tabla 7** para obtener un total de diez fracciones primarias (BtM1-10).

Tabla 7. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FI-M de *n*-butanol

| Sistema de elución | Fracciones recolectadas | Clave |
|----------------------------------|-------------------------|--------|
| Diclorometano/Metanol (60/40) | 1-2 | BtM-1 |
| | 3-7 | BtM-2 |
| | 8-9 | BtM-3 |
| | 10-13 | BtM-4 |
| | 14-18 | BtM-5 |
| | 19 | BtM-6 |
| | 20-25 | BtM-7 |
| | 26-27 | BtM-8 |
| | 28-30 | BtM-9 |
| | 31 | BtM-10 |



A la fracción Btm-7 se le realizó un fraccionamiento posterior mediante la técnica de CCA empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y CH₃OH como fase móvil.

Se colectaron 46 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron por su similitud en CCD con los sistemas de elución que se muestran en la **Tabla 8**, para obtener un total de cuatro fracciones secundarias (FII-1-4), mismas que fueron analizadas por HPLC-MS.

Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción Btm-7.

| Sistema de elución | Fracciones recolectadas | Clave |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------|
| Diclorometano/Metanol (70/30) | 1-13 | FII-1 |
| | 14-25 | FII-2 |
| | 26-34 | FII-3 |
| | 35-46 | FII-4 |

5.2.6 Procesamiento de la fracción FI-A obtenida del segundo fraccionamiento del extracto acuoso de *B. ternifolia* (apartado 5.2.3)

La fracción FI-A (parte soluble en acetona) se sometió a un proceso de fraccionamiento usando la técnica de CCA, empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y CH₃OH como fase móvil. Se colectaron 61 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica con el sistema de elución que se muestra en la **Tabla 9** para obtener un total de once fracciones primarias (BtA-1-11).

Las fracciones primarias BtA-9 y BtA-10 se analizaron por RMN-¹H y la fracción BtA-9 se analizó por RMN-¹³C.

**Tabla 9.** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FI-A de *n*-butanol.

| Sistema de elución | Fracciones recolectadas | Clave |
|----------------------------------|-------------------------|--------|
| Diclorometano/Metanol (80/20) | 1-23 | BtA-1 |
| | 24-31 | BtA-2 |
| | 32-38 | BtA-3 |
| | 39-43 | BtA-4 |
| | 44-45 | BtA-5 |
| | 46-48 | BtA-6 |
| | 49-50 | BtA-7 |
| | 51-52 | BtA-8 |
| | 53-57 | BtA-9 |
| | 58-60 | BtA-10 |
| 61 | BtA-11 | |

5.2.7 Determinación del contenido de fenoles totales

5.2.7.1 Curva patrón del ácido gálico

Para la construcción de la curva patrón se prepararon las siguientes soluciones: Solución stock de ácido gálico (800 µg/mL) por disolución de 16 mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich) en 20.0 mL de agua grado MilliQ.

Solución acuosa de carbonato de sodio al 8% (m/v) por disolución de 800 mg de Na₂CO₃ en 10.0 mL de agua grado MilliQ.

Solución del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, por dilución de 5.0 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma-Aldrich) en un volumen final de 10.0 mL con agua grado MilliQ.

Procedimiento: en una multiplaca de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas de la solución stock de ácido gálico para obtener un rango de concentraciones de 0.77 a 25.0 µg/mL. Posteriormente, se adicionaron en cada pozo 20 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se mantuvo en la oscuridad durante 8 min. Enseguida, se adicionaron 80 µL de Na₂CO₃ al 8% (m/v) y se mantuvo en reposo, en la oscuridad, por una hora. Finalmente, se realizó una lectura a 760 nm.



5.2.7.2 Cuantificación de fenoles totales en el extracto acuoso

Se preparó una disolución del extracto acuoso seco a una concentración de 1 mg/mL en metanol. En una placa de 96 pozos se colocaron 20 μ L de la disolución anterior y 80 μ L de agua MilliQ; a partir de la mezcla anterior se realizaron diluciones seriadas para ajustar los valores de concentración dentro del intervalo de linealidad de la curva patrón (apartado 5.2.7.1, considerando 5 niveles de concentración). A cada pozo se adicionaron 10 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mantuvo por 8 min en la oscuridad. Enseguida, se adicionaron 80 μ L de Na_2CO_3 al 8% (m/v) y se mantuvo en reposo por una hora en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo se determinó la lectura a 760 nm. El análisis de este extracto se realizó por triplicado.

5.2.8 Determinación del contenido de flavonoides totales

5.2.8.1 Curva patrón de quercetina.

Para la elaboración de la curva patrón se prepararon las siguientes soluciones: Solución stock de quercetina a una concentración de 0.2 mg/mL (2 mg de quercetina (Sigma-Aldrich) en 10.0 mL en metanol)

Solución de AlCl_3 al 2% (m/v) (200 mg de AlCl_3 (J.T. Baker) en 10.0 mL de metanol).

Procedimiento: en una placa de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas de la solución stock para obtener un rango de concentraciones de 0.0031 a 0.05 mg/mL. 100 μ L de la solución de tricloruro de aluminio al 2% (m/v) se adicionaron a cada uno de los pozos y se dejó reposar por 15 min en la oscuridad. Finalmente, se realizó una lectura a 420 nm.

5.2.8.2 Cuantificación de flavonoides totales en el extracto acuoso.

100 μ L del extracto acuoso (apartado 5.2.7.2) se diluyeron en 100 μ L de metanol. Enseguida, se realizaron diluciones seriadas para asegurar que la concentración de la muestra se encontrara dentro del rango de linealidad de la curva patrón (apartado 5.2.8.1). Finalmente, 80 μ L de la dilución seleccionada se colocaron en cada pozo y se agregaron 100 μ L de solución de AlCl_3 al 2%.



La mezcla de reactivos se dejó reposar por 15 min en la oscuridad. Por último, se registró la absorbancia a 420 nm. El análisis se realizó por triplicado.

5.2.9 Determinación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* de los extractos orgánicos y de sus fracciones

La evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones y de los compuestos aislados sobre la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich®), se realizó utilizando la metodología descrita por Rangel, 2015.

Preparación de la solución stock de la enzima: se resuspendió 1 mg de liofilizado de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* en 500 μ L de solución amortiguadora de fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 100 mM, pH=7) y se dejó rehidratar por 4 horas. Posteriormente, se realizó una dilución para obtener una concentración final de 1 U/mL.

Preparación de la solución de p -nitrofenol- α -D-glucopiránosido. Se pesaron 3 mg de p -nitrofenol- α -D-glucopiránosido y se disolvieron en 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, para obtener una concentración de 5 mM.

Todas las evaluaciones se realizaron en placas de Elisa de 96 pozos (250 μ L de capacidad), y se leyeron las absorbancias utilizando un lector de placas marca BioRad® modelo iMark a una longitud de onda de 415 nm.

Cada extracto, fracción o compuesto aislado se evaluó como inhibidor de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* preparando soluciones stock de cada muestra a concentraciones de 10000 ppm para los extractos y/o fracciones y de 30 mM para compuestos puros.

Posteriormente, se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para cada muestra. Para esto, se evaluaron cinco concentraciones de cada inhibidor que estuvieran en el intervalo del 10 al 100 % de inhibición.

Procedimiento: se vierten a los pozos de las placas 20 μ L de la solución de la enzima y el volumen de inhibidor correspondiente a la concentración a evaluar y se completa el volumen a 90 μ L con amortiguador de fosfatos (100 mM, pH=7).



Posteriormente, la placa se incubó durante 10 min a 37°C. Al término de este periodo de incubación, se adicionaron a cada pozo 10 µL del sustrato ρ -nitrofenol- α -D-glucopiránosido (ρ -NPG; 5 mM), enseguida se determinaron las absorbancias de las muestras a tiempo cero (T_0). Inmediatamente, se incubó por segunda vez la placa a 37°C durante 20 minutos para obtener el T_{20} . El ensayo se basa en la cuantificación de la cantidad de ρ -nitrofenol liberado al medio, el cual es directamente proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizado por la enzima. Como control positivo se utilizó acarbosa partiendo de una solución stock 30 µM, disuelta en solución amortiguadora de fosfatos (9.7 mg de acarbosa en 500 µL de solución amortiguadora de fosfatos).

Los resultados representan el promedio de tres réplicas. El porcentaje de inhibición de las muestras se determinó utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\left(1 - \left(\frac{A_{T20} - A_{T0}}{A_{BT20} - A_{BT0}}\right)\right) 100 = \% \text{ de inhibición}$$

Dónde:

A_{T20} es la absorbancia de la muestra registrada a los 20 minutos de reacción;

A_{T0} es la absorbancia de la muestra registrada al tiempo cero de reacción;

A_{BT20} es la absorbancia del blanco registrada a los 20 minutos de reacción y

A_{BT0} es la absorbancia del blanco registrada al tiempo cero de reacción.

Los valores de CI_{50} (concentración requerida para inhibir en un 50% la actividad de la enzima) se calcularon a partir del ajuste de las curvas obtenidas al graficar el porcentaje de inhibición contra la concentración, utilizando un análisis de regresión no lineal con la ecuación de Hill en el programa Origin 8.0.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para cumplir con el objetivo general de este trabajo de investigación se siguió la siguiente estrategia: primeramente, se llevó a cabo la determinación botánica de la especie y posteriormente se obtuvo la infusión de la materia prima desecada. Estudios recientes mostraron que esta planta tiene propiedades hipoglucemiantes por lo que motivó al estudio químico de sus fracciones orgánicas y de sus componentes, dirigiendo esto hacia la búsqueda de compuestos con un efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa. Los resultados obtenidos se refieren a continuación.

6.1 Análisis químico de la fracción de AcOEt

El fraccionamiento por reparto con AcOEt de la infusión de *B. ternifolia* produjo por concentración, un precipitado de color amarillento cuyo análisis espectroscópico por RMN-¹H mostró que se trataba de una mezcla de flavonoides y azúcares (**Figura A1**, ver anexo). Esta fracción se separó en sus componentes principales por cromatografía en Sephadex, obteniéndose mayoritariamente un precipitado de color amarillo en la fracción Btae-11, el cual mostró homogeneidad cromatográfica, muy fluorescente al UV, y fue separado por decantación de la suspensión, secado a vacío y analizado por RMN-¹H y RMN-¹³C; se identificó como quercetina (**Figura 8**), con base en las propiedades espectroscópicas que se discuten a continuación:

En el espectro de RMN-¹H, se observaron dos señales dobles que integraron cada una para un protón, acopladas entre sí (espectro, RMN-¹H **Figura A2**, ver anexo) con constantes de acoplamiento de 2.0 Hz, lo que indicó un sistema de protones aromáticos en posición meta entre sí.

En el espectro de RMN-¹³C (**Figura A3**, ver anexo) se observaron 15 señales de carbonos sp²; de las cuales, 5 correspondieron a carbonos aromáticos base de oxígeno (carbonos 5, 7, 9, 3' y 4'), dos carbonos vinílicos (C-2 y 3), cinco carbonos aromáticos protonados (C-6, 8, 2', 5' y 6'), dos carbonos aromáticos cuaternarios (C-10 y 1') y un carbonilo (C-4).



También se observó un grupo de tres señales de un sistema ABX, integrando cada una de ellas para un protón, de un anillo aromático trisustituído que consistieron de un doblete (δ_H 6.88 con constante de acoplamiento 8.9 Hz), un doble de dobles (δ_H 7.63 con constantes de acoplamiento 8.5 y 2.0 Hz) y un doblete en δ_H 7.73 con constante de acoplamiento meta (2.0 Hz). Estas señales fueron asignadas a los hidrógenos 5', 6' y 2' de la molécula. Los experimentos HSQC, COSY y HMBC, permitieron la asignación del resto de señales para la molécula de quercetina (**Figs. A4, A5, A6**, respectivamente, ver anexo).

En la **Tabla 10** se muestran los desplazamientos químicos del compuesto aislado y coinciden con los descritos en la literatura para la quercetina (Zhang et al., 2014).

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN- 1H y ^{13}C de la quercetina.

| Posición | Literatura* | | Experimentales** | |
|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| | 1H | ^{13}C | 1H | ^{13}C |
| 2 | | 147.2 | | 147.9 |
| 3 | | 136.1 | | 137.2 |
| 4 | | 176.2 | | 177.3 |
| 5 | | 161.1 | | 162.4 |
| 6 | 6.19 (d, <i>J</i> , 2.1) | 98.6 | 6.15 (d, <i>J</i> , 2.0) | 99.2 |
| 7 | | 164.3 | | 165.5 |
| 8 | 6.42 (d, <i>J</i> , 2.1) | 93.8 | 6.39 (d, <i>J</i> , 2.0) | 94.3 |
| 9 | | 156.6 | | 158.2 |
| 10 | | 103.4 | | 104.5 |
| 1' | | 122.4 | | 124.1 |
| 2' | 7.66 (d, <i>J</i> , 2.1) | 115.4 | 7.73 (d, <i>J</i> , 2.0) | 115.9 |
| 3' | | 145.4 | | 146.2 |
| 4' | | 148.1 | | 148.7 |
| 5' | 6.88 (d, <i>J</i> , 8.4) | 116.0 | 6.88 (d, <i>J</i> , 8.9) | 116.2 |
| 6' | 7.53 (dd, <i>J</i> , 8.4, 2.1) | 120.5 | 7.63 (dd, <i>J</i> , 8.5, 2.0) | 121.6 |

*Experimento en DMSO- d_6 , 500 MHz

**Experimento en MeOH- d_4 400 MHz

Las constantes de acoplamiento (*J*) están descritas en Hz

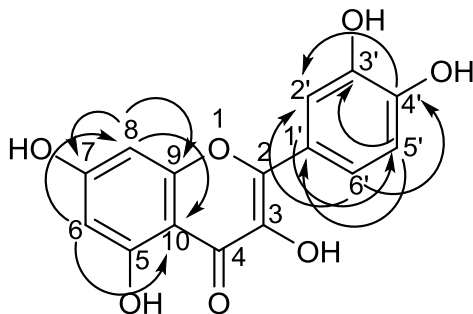


Figura 8. Estructura de la quercetina y principales correlaciones observadas en el espectro HMBC.

6.2 Análisis de la fracción de *n*-butanol

El procesamiento de la fracción FI-M como se refiere en el apartado 5.2.5 derivó en la obtención de cuatro fracciones secundarias (**Tabla 8**) que al ser analizadas por HPLC-MS mostraron evidencia de lo que a continuación se describe.

La fracción FII-2 (**Figura 9**) contenía seis picos mayoritarios de los cuales, el de tiempo de retención de 1.5 min mostró en el espectro de masas el peso molecular correspondiente a la escopoletina. Esta cumarina ya fue identificada con anterioridad en *Bouvardia ternifolia* (García-Morales et al., 2015) (**Figura 10**).

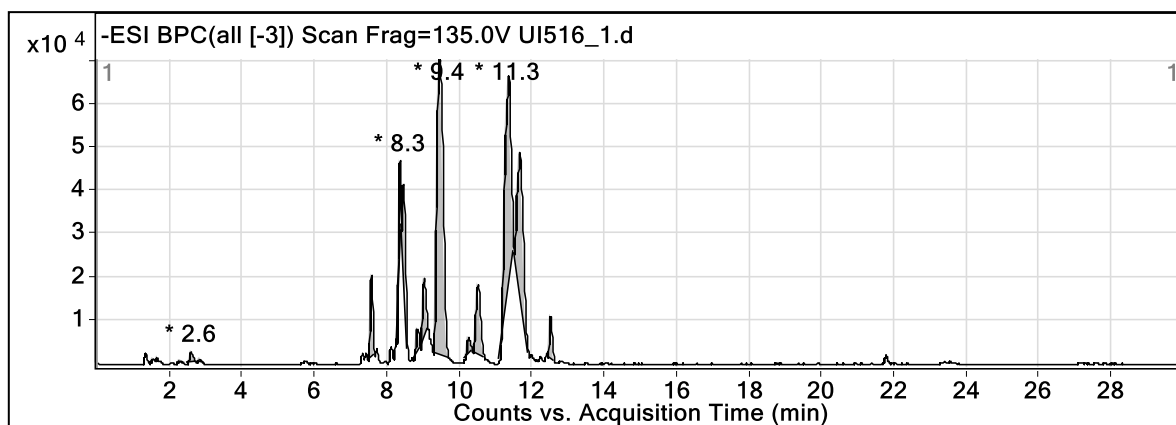


Figura 9. Cromatograma obtenido de la fracción FII-2.

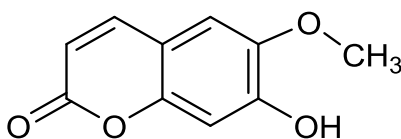


Figura 10. Estructura de la escopoletina.



El análisis de los espectros de masas de los otros componentes de esta fracción mostró similitudes con los de la fracción FII-3 como fueron la rutina y la metilrutina, por lo que se describen con más detenimiento en la fracción FII-3.

Dos compuestos que ya han sido aislados de la especie vegetal son los péptidos bouvardina y desoxibouvardina (Bates et al., 1983; Jolad et al., 1977) que muy probablemente correspondan a los picos en 7.3 y 9.3 min, con iones moleculares de $771 [M - H]^+$ y de $755 [M - H]^+$ respectivamente (**Figura 11**).

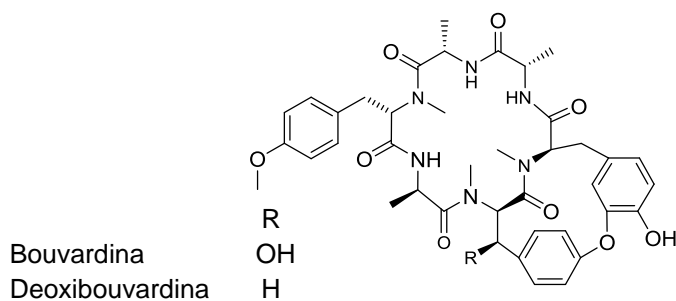


Figura 11. Estructura de la bouvardina y la desoxibouvardina.

La fracción FII-3 contenía cinco picos mayoritarios (**Figura 12**) los cuales se describen a continuación.

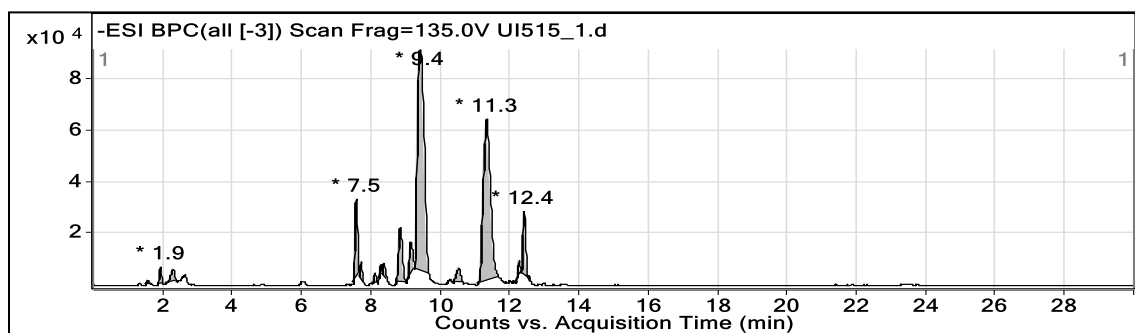


Figura 12. Cromatograma obtenido de la fracción FII-3.

1. En 7.5 min, un pico cuyo espectro de masas mostró un ión molecular de m/z $353 [M - H]^+$, correspondiente al ácido clorogénico. El espectro de masas también mostró una pérdida de 162 unidades de masa que corresponde a la pérdida de un residuo de ácido cafeico para dar el ión en m/z 191 correspondiente a un residuo de ácido quínico (**Figura 13**). Este compuesto ha sido identificado con anterioridad en *B. ternifolia* (García-Morales et al., 2015).

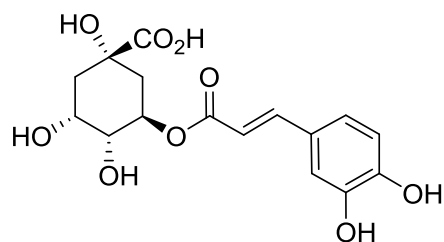


Figura 13. Estructura del ácido clorogénico.

2. En 9.4 min, un pico cuyo espectro de masas mostró un ión molecular de 609 $[M - H]^+$, correspondiente a la molécula de rutina (**Figura 14**) identificada anteriormente en la especie vegetal (Herrera-Ruíz et al., 2012; García-Morales et al., 2015).

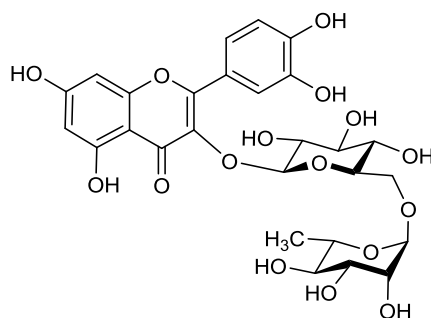


Figura 14. Estructura de la rutina.

3. En 10.4 min, un pico cuyo espectro de masas mostró un ión molecular de 661 $[M - H]^+$ de un compuesto que no se pudo elucidar, pero el fragmento a m/z 463 del mismo espectro corresponde al 3-O-glucopiranosido de quercetina (**Figura 15**).

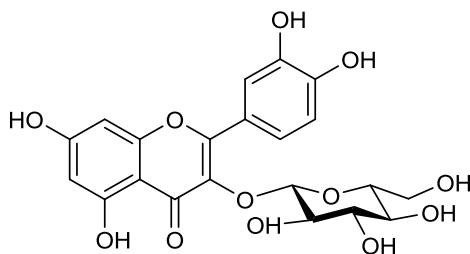


Figura 15. Estructura de 3-O-glucopiranosido de quercetina.

4. En 11.3 min, un pico cuyo espectro de masas mostró un ión molecular de 623 $[M - H]^+$, correspondiente a la molécula de rutina metilada en uno de sus grupos hidroxilo (**Figura 16**).

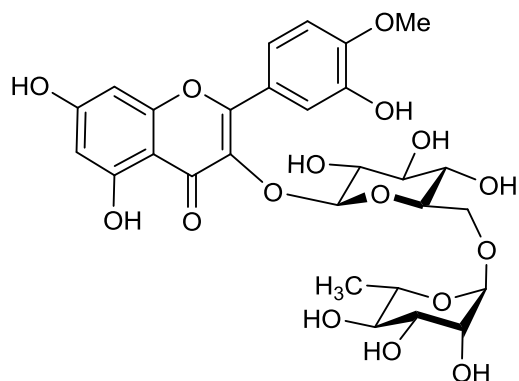


Figura 16. Estructura de la rutina metilada.

5. En 12.2, un pico cuyo espectro de masas mostró un ión molecular de 477 $[M - H]^+$ y una pérdida de 30 unidades de masa, probablemente de un grupo metoxilo que previamente perdió un hidrógeno. En conjunto, el peso molecular ajusta para la estructura de 3-O-metil-ramnopiranosido de quercetina (**Figura 17**).

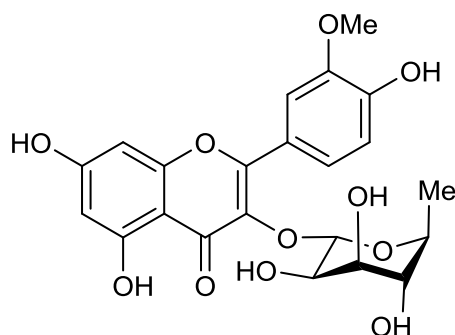


Figura 17. Estructura de 3-O-metil-ramnopiranosido de quercetina.

6.3 Determinación del contenido de fenoles totales.

Para la determinación de la cantidad de fenoles totales en la muestra vegetal se construyó una curva de calibración con ácido gálico. A continuación se ilustra la curva de calibración del ácido gálico (con su ecuación de recta correspondiente) y una representación gráfica de la reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu (**Figura 18** y **Figura 19** respectivamente).

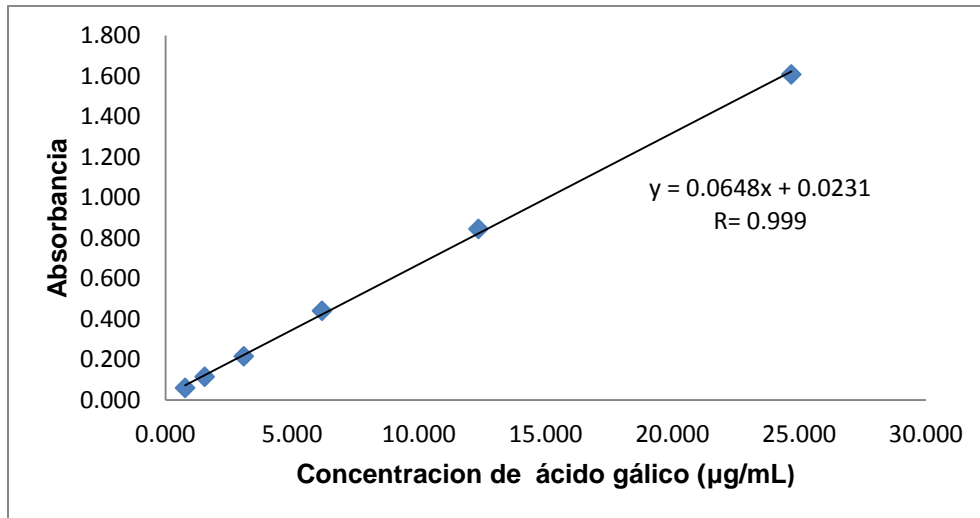


Figura 18. Curva de calibración para determinar la cantidad total de fenoles utilizando como referencia ácido gálico.

Para realizar esta determinación se evaluaron diferentes proporciones de la disolución del extracto seco de la infusión en metanol (1 mg/mL).

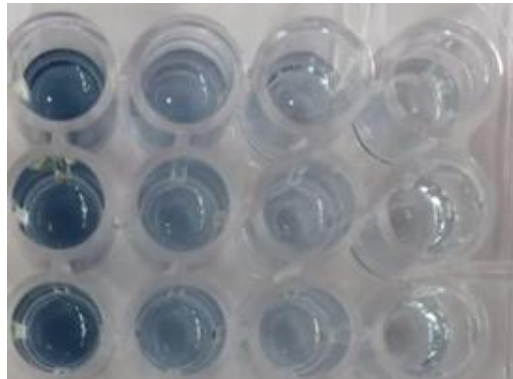


Figura 19. Representación gráfica de la reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu en la multiplaca.

Los datos de absorbancia obtenidos de las tres réplicas realizadas, se interpolaron en la curva (**Figura 18**) y aplicando los diferentes factores de dilución se obtuvieron las concentraciones de las diferentes réplicas (de éstas se calculó un promedio); el promedio se relacionó con la cantidad de extracto utilizado para preparar la disolución en metanol y el valor obtenido se expresó en mg (EAG)/g de infusión (**Tabla 11**).



Tabla 11. Valores de concentración obtenidos de las tres réplicas para el análisis de fenoles totales.

| Réplica | Absorbancia | Concentración [μg (EAG)/mL de ext]* |
|---------|-----------------|--------------------------------------------------|
| 1 | 0.290 | 41.19 |
| 2 | 0.271 | 38.56 |
| 3 | 0.282 | 39.95 |
| | Promedio | 39.90 |
| | SD | 1.32 |
| | %C.V | 3.31 |

*mg equivalentes a ácido gálico (EAG)/ mL de extracto

El cálculo de las concentraciones de cada una de las réplicas se realizó mediante el siguiente algoritmo de cálculo:

$$\frac{\mu\text{g}(EAG)}{\text{mL de ext}} = \left[\frac{Abs - b}{m} \right] * FD$$

Dónde:

Abs= Absorbancia de la réplica

b= ordenada al origen

m= pendiente

FD= Factor de dilución

Cálculo para la réplica 1.

$$\frac{\mu\text{g}(EAG)}{\text{mL de ext}} = \left[\frac{0.290 - 0.0231}{0.0648} \right] * \left(\frac{100\mu\text{L}}{50\mu\text{L}} \right) \left(\frac{100\mu\text{L}}{20\mu\text{L}} \right) = \frac{41.188\mu\text{g}(EAG)}{\text{mL de ext}} = \frac{41.19\mu\text{g}(EAG)}{\text{mL de ext}}$$



Relacionando la concentración promedio obtenida con la cantidad de extracto utilizado:

$$1 \text{ mL de ext} \left(\frac{39.90 \mu\text{g (EAG)}}{\text{mL de ext}} \right) \left(\frac{1}{1 \text{ mg de ext}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg de ext}}{1 \text{ g ext}} \right) \left(\frac{1 \text{ mg (EAG)}}{1000 \mu\text{g (EAG)}} \right) \\ = \frac{39.90 \text{ mg (EAG)}}{\text{g de infusión}}$$

Se obtuvo un resultado de 39.90 mg (EAG)/g de la infusión, encontrándose así, dentro del rango de valores del contenido de fenoles totales reportados en la literatura para plantas medicinales y que han demostrado presentar actividad antioxidante importante (Doroteo et al., 2013; González-Nossa et al., 2015).

6.6 Determinación del contenido de flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales se construyó una curva de calibración empleando quercetina, con intervalo de concentraciones de 0.0031 a 0.05 mg/mL. En la **Figura 20** se muestra la gráfica y la ecuación de la recta correspondiente.

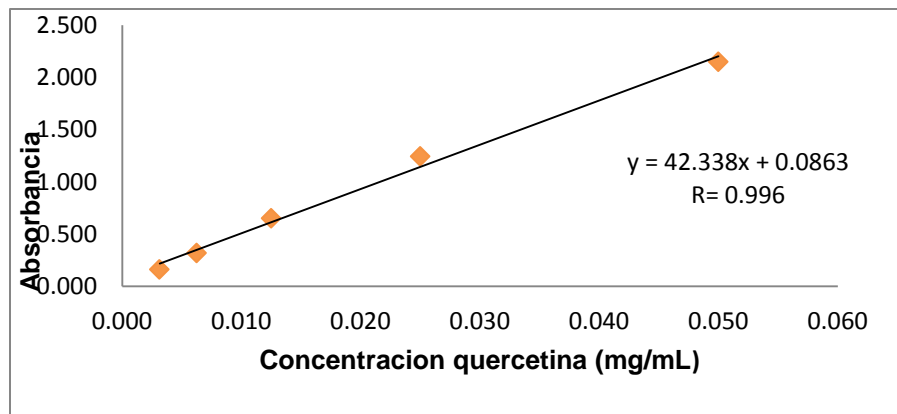


Figura 20. Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales utilizando como referencia a la quercetina.

De la misma manera que en el caso de la determinación del contenido de fenoles totales, en este experimento los cálculos se realizaron calculando la concentración interpolada en la curva y el factor de dilución (**Tabla 12**). Finalmente el promedio



obtenido se relacionó con la cantidad del extracto y el valor obtenido se expresó en equivalentes de quercetina por gramo de la infusión.

El cálculo de las concentraciones de cada una de las réplicas se realizó mediante el siguiente algoritmo de cálculo:

$$\frac{\mu g (EQ)}{mL de ext} = \left[\frac{Abs - b}{m} \right] * FD$$

Donde:

Abs= Absorbancia de la réplica

b= ordenada al origen

m= pendiente

FD= Factor de dilución

Cálculo para la réplica 1.

$$\frac{\mu g (EQ)}{mL de ext} = \left[\frac{0.298 - 0.0863}{42.338} \right] * \left(\frac{200 \mu L}{100 \mu L} \right) = \frac{0.0100 \mu g (EQ)}{mL de ext}$$

Tabla 12. Valores de concentración obtenidos de las tres réplicas para el análisis de flavonoides totales.

| Réplica | Absorbancia | Concentración [mg (EQ)/mL de ext]* |
|---------|-----------------|-------------------------------------|
| 1 | 0.298 | 0.0100 |
| 2 | 0.312 | 0.0107 |
| 3 | 0.318 | 0.0109 |
| | Promedio | 0.0105 |
| | SD | 0.0004 |
| | %C.V | 3.8 |

*mg equivalentes a quercetina (EQ) /mL de extracto



Relacionando la concentración promedio obtenida con la cantidad de extracto utilizado:

$$1 \text{ mL de ext} \left(\frac{0.0105 \mu\text{g (EQ)}}{\text{mL de ext}} \right) \left(\frac{1}{1 \text{ mg de ext}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg de ext}}{1 \text{ g ext}} \right) = \frac{10.5 \text{ mg (EQ)}}{\text{g de extracto de infusión}}$$

Se obtuvo un resultado de 10.5 mg (EQ)/g de extracto de la infusión. De acuerdo a reportes en la literatura, este valor obtenido no es significativo, ya que al determinar la actividad antioxidante de algunas plantas medicinales con valores del contenido de flavonoides totales menores a 15.0 mg (EQ)/g de extracto, mostraron tener un potencial antioxidante bajo (Doroteo et al., 2013).

6.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos orgánicos y de sus fracciones sobre la enzima α -glucosidasa de levadura

6.4.1 Evaluación del efecto del extracto de AcOEt

Se determinó el efecto inhibitorio de los extractos y de los compuestos aislados sobre la enzima α -glucosidasa mediante un ensayo espectrofotocolorimétrico. La reacción se basa en la cuantificación de *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del α -D-glucósido de *p*-nitrofenol (*p*-NPG) empleado como sustrato, por la α -glucosidasa que no haya sido inhibida por los compuestos o extractos de prueba. Así, la actividad inhibitoria de los compuestos de prueba hacia la enzima α -glucosidasa es inversamente proporcional a la cantidad del *p*-nitrofenol libre generado durante la reacción (Oki et al., 1999).

La **Figura 21** muestra la curva de inhibición por parte del extracto de AcOEt en donde se observa una inhibición significativa de la enzima α -glucosidasa a la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 223.06 ± 21.96 ppm alcanzando un porcentaje de inhibición del 65%.

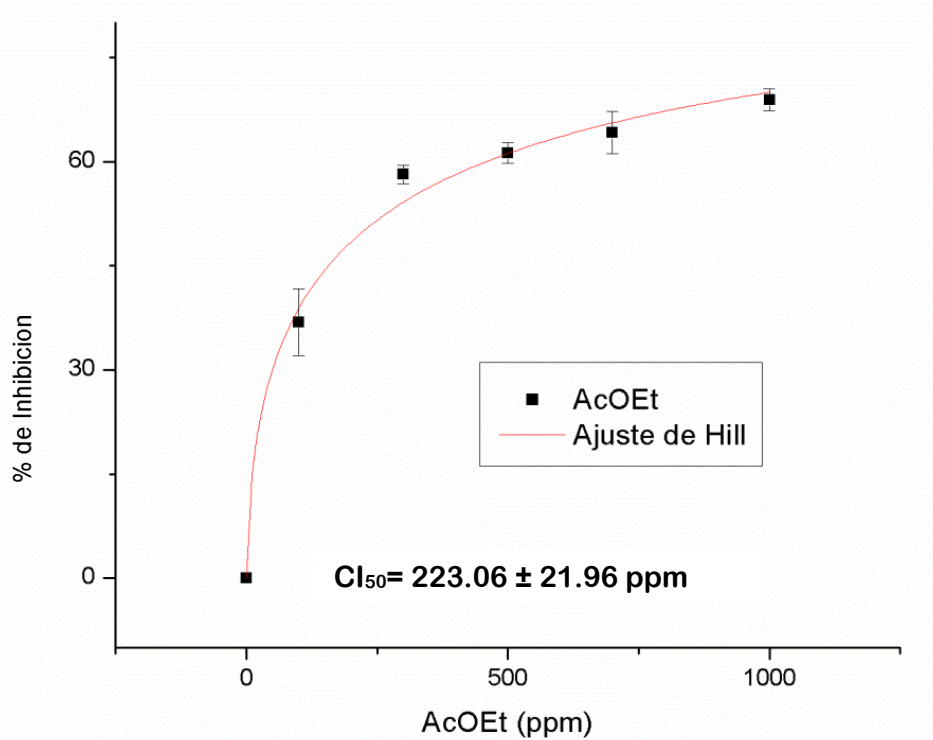


Figura 21. Curva de inhibición enzimática del extracto de AcOEt.

El resultado obtenido sugiere la presencia de metabolitos inhibidores de la enzima α -glucosidasa presentes en el extracto estudiado, por lo que se procedió a aislar los componentes de este extracto y proceder a su evaluación.

6.3.1.1 Evaluación del efecto de la quercetina sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa

La quercetina aislada a partir de la fracción de AcOEt (fracción Btae-11) fue evaluada mediante el mismo ensayo, comparando su actividad inhibitoria con la de la acarbosa (**Figura 22**). La quercetina (fracción Btae-11) mostró una $CI_{50} = 189.85 \pm 12.77 \mu M$ (**Figura 23**).

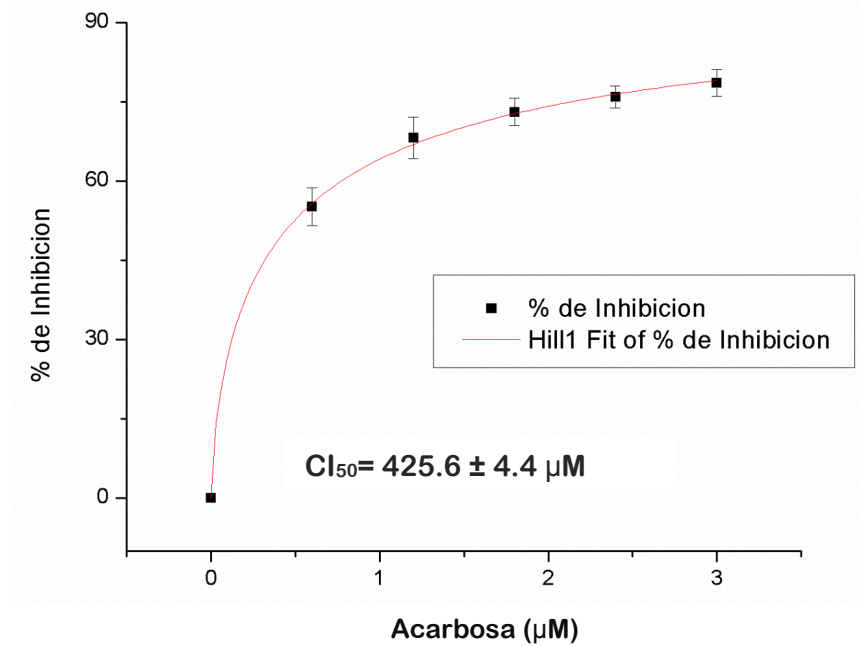


Figura 22. Curva de inhibición enzimática de la acarbosa.

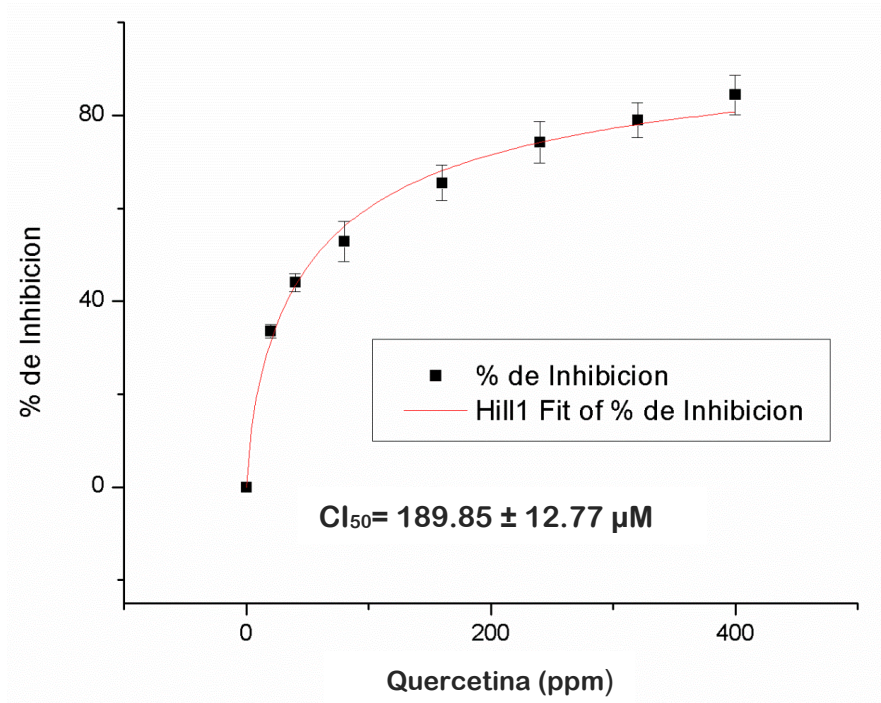


Figura 23. Curva de inhibición enzimática de la quercetina.



6.3.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas del fraccionamiento con *n*-butanol.

El resultado de las evaluaciones de los extractos y fracciones cromatográficas que presentaron una actividad importante ante la enzima α -glucosidasa se muestra en la **Tabla 13**, siendo la BtA-10 la más activa integrada por la quercetina.

Tabla 13. Resultados obtenidos de la evaluación sobre la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

| Muestra | CI ₅₀ |
|-----------|------------------------|
| FI-A | 725.13 ± 80.60 ppm |
| BtA-9 | 55.51 ± 8.41 ppm |
| BtA-10 | 16.71 ± 0.024 μ M |
| FII-4 | 296.00 ± 18.59 ppm |
| Acarbosa* | 448.88 ± 19.81 μ M |

*Control positivo utilizado en el ensayo

La fracción FI-A (**Figura 24**) fue la menos activa para este ensayo ya que la CI₅₀ calculada fue de 725.13 ± 80.60 ppm.

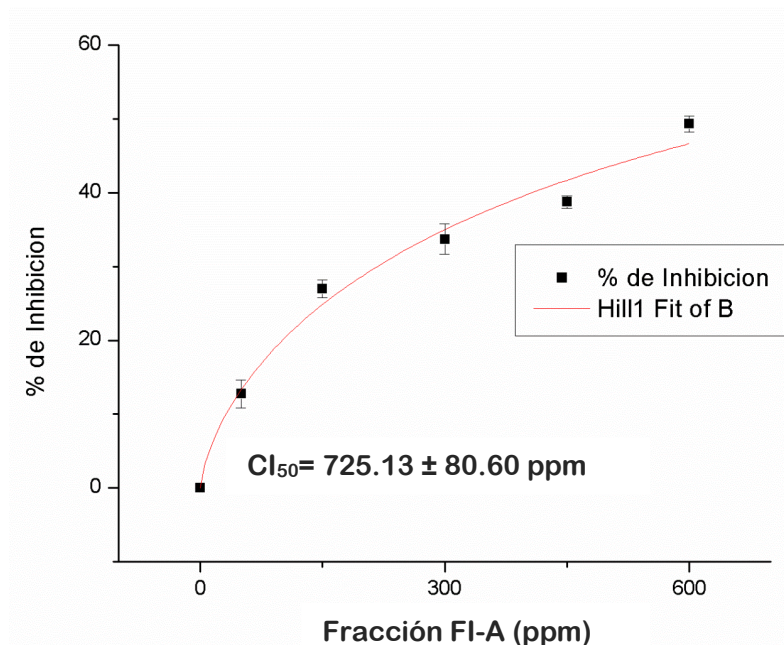


Figura 24. Curva de inhibición de la fracción FI-A.



En cuanto a la fracción BtA-9, la cual resultó ser una mezcla de quercetina y Kaempferol, mostró una $CI_{50} = 55.51 \pm 8.41$ ppm (**Figura 25**). Por otro lado la fracción BtA-10 mostró la mejor actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa en comparación a las fracciones restantes y al control (acarbossa), ya que la CI_{50} calculada fue de $16.71 \pm 0.024\mu M$ (**Figura 26**). Cabe mencionar que esta fracción demostró tener quercetina mayoritariamente, de acuerdo a su espectro de RMN- 1H , comparado con el del compuesto puro aislado de la fracción Btae-11, por lo que el valor obtenido en cuanto a su CI_{50} es mejor que el reportado en la literatura (Proença et al., 2017).

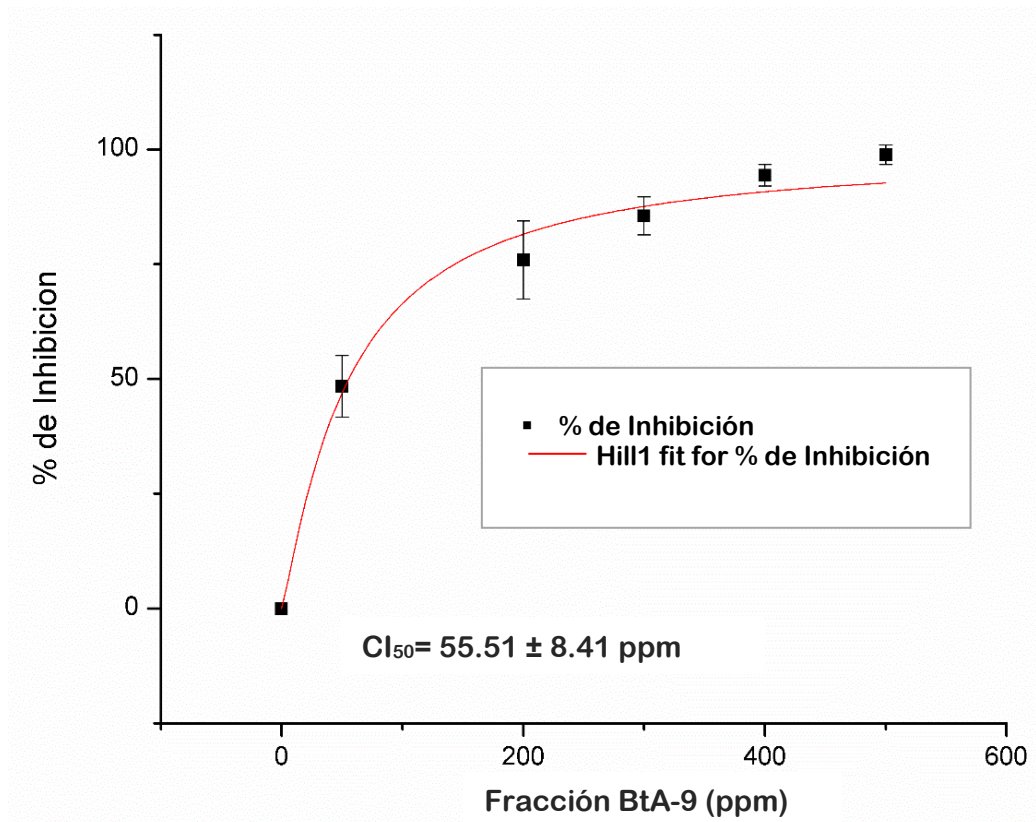


Figura 25. Curva de inhibición de la fracción BtA-9.

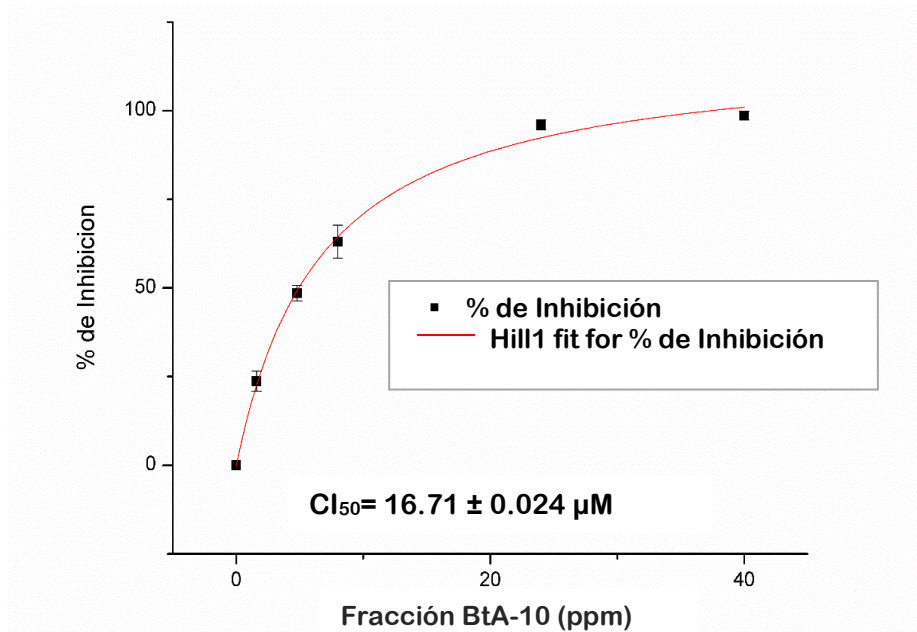


Figura 26. Curva de inhibición de la fracción BtA-10.

La fracción secundaria FII-4 estuvo integrada por una mezcla de los mismos componentes contenidos en FII-3, de acuerdo a su análisis comparativo por HPLC-MS y de igual forma presentó una actividad importante en este ensayo, con una CI_{50} calculada de 296 ± 18.59 ppm (**Figura 27**). Cabe considerar que en este caso, no se trata de compuestos puros sino en mezcla.

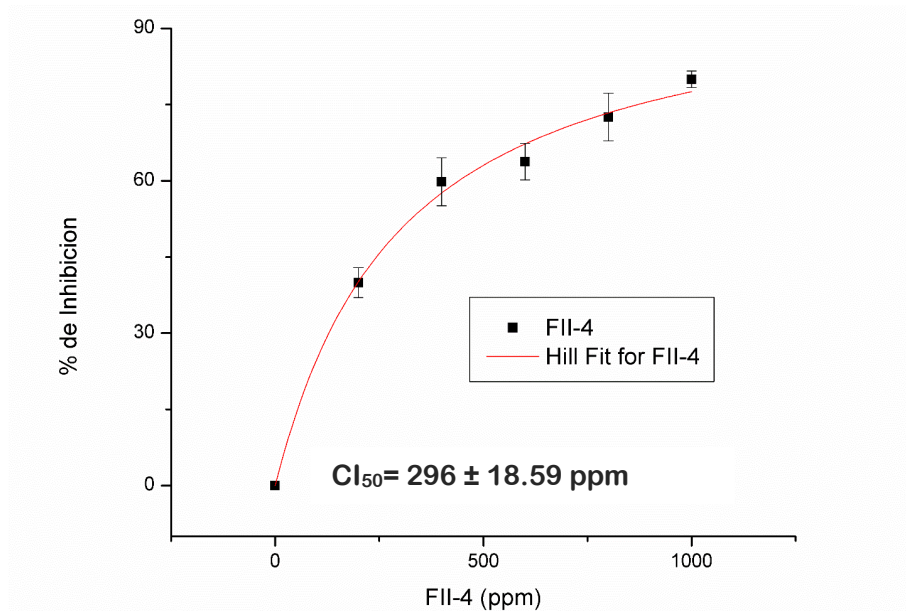


Figura 27. Curva de inhibición de la fracción FII-4.



7. CONCLUSIONES

1. *Bouvardia ternifolia* contiene compuestos de tipo éster de polifenol, cumarinas y algunos péptidos, los cuales fueron identificados por el análisis de HPLC-MS.
2. El estudio químico de las partes aéreas de *B. ternifolia* mostró la presencia de flavonoides como componentes mayoritarios de la infusión tales como la quercetina, rutina, 3-O-ramnopiranosido de quercetina y 3-O-glucopiranosido de quercetina.
3. Los extractos obtenidos por reparto y sus fracciones cromatográficas correspondientes, mostraron tener efecto importante y novedoso en el potencial inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa, resultando así tener un probable efecto antihiper glucémico.
4. De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de determinación de fenoles y flavonoides, la planta contiene una cantidad importante de compuestos fenólicos, resultando así con un posible potencial antioxidante.

8. PERSPECTIVAS

1. Continuar con el estudio fitoquímico de los extractos de acetato de etilo y de *n*-butanol de *B. ternifolia* para establecer su composición.
2. Realizar ensayos farmacológicos *in vivo* que validen el uso de esta planta como posible tratamiento para la diabetes mellitus.
3. Llevar a cabo pruebas biológicas apropiadas con extractos y compuestos aislados de *Bouvardia ternifolia* debido a que, en estudios previos, se ha encontrado que esta planta posee actividad antioxidante importante.



9. REFERENCIAS

- *Alma-Ata, (1978)*. Accesible en línea: www.alma.ata.es/declaraciondealmaata/Declaraciondealmaata.htm. Recuperado: 16 de agosto de 2018.
- American Diabetes Association. (2019). *Standards of Medical Care in Diabetes*. *Diabetes Care*, 42(1), 204.
- Andersson, L. y Rova, J. H. E. (1999): *The rps16 intron and the phylogeny of the Rubiaceae*. *Plant Systematics and Evolution*. 214: 161–186.
- Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. (2005). *Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes*. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348.
- Aoki, K., Sato, H., Terauchi, Y. (2019). *Usefulness of antidiabetic alpha-glucosidase inhibitors: a review on the timing of administration and effects on gut hormones*. *Endocrine Journal*, 66(5), 395-401.
- Argueta-Villamar, A., Cano-Asseleih L. M., Rodarte M. E. (1994). *Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. México. CDMX.
- Arumugam, G., Manjula, P., Paari, N. (2013). *A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus*. *Journal of Acute Disease*, 2(3), 196-200.
- Bates, R. B., Cole, J. R., Hoffmann, J. J., Kriek, R. G., Linz, S. G., Torrance, J. S. (1983). *Solution forms of Bouvardin and relatives from NMR studies. 6-O-methylbouvardin*. *Journal of the American Chemical Society*. 105(5), 1343-1347.
- Benalla, W., Bellahcen, S., Bnouham, M. (2010). *Antidiabetic Medicinal Plants as a Source of Alpha Glucosidase Inhibitors*. *Current Diabetes Reviews*, 6(4), 247-254.



- Bhagour, K., Arya, D., Gupta, R. S. (2016). *A review: Antihyperglycemic plant medicines in management of diabetes*. *Acupuncture and Related Therapies*, 4(4), 7-16.
- Blackwell, H. W. (1968). *Revision of Bouvardia (Rubiaceae)*. *Annals Missouri Botanic Garden*, 55 (1), 1-30.
- Borges de Melo, E., Silveira, G. A., Carvalho, I. (2006). *α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity*. *Tetrahedron*, 62(44), 10277-10302.
- Chiba, S. (1997). *Review: Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61(8), 1233-1239.
- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., Rodríguez-Landa, J. F. (2004). *Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas*. *Revista Biomédica*, 15(2), 123-136.
- Cruz Fausto. V. (2017). *Fraccionamiento de la planta Bouvardia ternifolia Schltl en la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida* Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM
- Derosa G., Maffioli, P. (2012). *α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice*. *Archives of Medical Science*, 5, 899-906.
- Doroteo, V. H., Díaz C., Terry C., Rojas R. (2013). *Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas*. *Revista de la Sociedad Química del Perú* [online], 79(1), 13-20. Accesible en línea: <http://sqperu.org.pe/wp-content/uploads/2017/07/Revista-SQP-Vol-79-N1-2013.pdf>. Recuperado el 02 de agosto del 2019.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.



- García-Morales, G., Huerta-Reyes, M., Gonzáles-Cortazar, M., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, E., Silva-García, R., Román-Ramos, R., Aguilar-Rojas, A. (2015). *Anti-inflammatory, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of Bouvardia ternifolia: potential implications in Alzheimer's disease*. Archives of Pharmacal Research, 38(7), 1369-1379.
- González-Nossa, D. L., Talero-Pérez, Y. V., Rozo-Núñez, W. E. (2015). *Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos polares de comfrey (Symphytum officinale L)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales [online], 21(2), 125-132. Accesible en línea: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/296/164>. Recuperado el 02 de agosto del 2019.
- Herrera-Ruíz, M., García-Morales, G., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Tortoriello, J., Ventura-Zapata, E., Jiménez-Ferrer, E. (2012). *Inhibition of acetylcholinesterase activity by hidroalcoholic extract and their fractions of Bouvardia ternifolia (Cav.) Shcldl (Rubiaceae)*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 11(6), 526-541.
- *Integrated Taxonomic Information System*. Accesible en línea: <https://www.itis.gov/>. Recuperado el 25 de Marzo del 2019.
- International Diabetes Federation. Accesible en línea: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html>. Recuperado 15 de Mayo del 2019.
- International Diabetes Federation. (2017). *Diabetes Atlas*. 8 ed. Accesible en línea: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/134-idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>. Recuperado el 15 de Mayo del 2019.
- Israili, H. Z. (2011). *Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus*. American Journal of Therapeutics, 18, 117–152.



- Jiménez-Ferrer, E., Reynosa-Zapata, I. Pérez-Torres, E., Tortoriello, J. (2005). *The secretagogue effect of the poison from *Centruroides limpidus limpidus* on the pancreas of mice and the antagonistic action of the *Bouvardia ternifolia* extract*. *Phytomedicine*, 12(1-2), 65-71.
- Jiménez-Ferrer, E., Tortoriello, J. (1999). *Plantas medicinales mexicanas utilizadas en el tratamiento de la picadura de alacrán*. 4a Reunión Regional de Investigación Médica, Región Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social, 109.
- Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Torrance, S. J., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R., Arora, S. K., Kriek, G. R. (1977). *Bouvardin and deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae)*. *Journal of the American Chemical Society*, 99(24), 8040-8044.
- Kalra, S. (2014). *Alpha glucosidase inhibitors*. *Journal of Pakistan Medical Association*. 64(4), 474-476.
- Krentz, A. J., Bailey, C. J. (2005). *Oral Antidiabetic Agents: Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus*. *Drugs*. 65(3), 385-411.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. (2011). *α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes*. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 19-29.
- Mabberley D. J. (1997). *The Plant Book*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, 858.
- Martínez, M. (1989). *Las plantas medicinales de México*. 6 ed. Librería y ediciones Botas. México. 656.
- Martínez, M. (1979). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. 1° ed. Fondo de Cultura Económica. México. 1248.



- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I. (2013). *Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α -Glucosidases*. *Journal of Natural Products*, 76(3), 468-483.
- Moorthy, N. S. H. N., Ramos, M. J., Fernandes, P. A. (2012). *Studies on α -glucosidase inhibitors development: magic molecules for the treatment of carbohydrate mediated diseases*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8), 1-8.
- Naturalista. Trompetilla (Bouvardia). (2019). CONABIO. Accesible en línea: <https://www.naturalista.mx/taxa/147991-Bouvardia>. Recuperado el 12 de Abril del 2019.
- Naturalista. Trompetilla (Bouvardia ternifolia). (2019). CONABIO. Accesible en línea: <https://www.naturalista.mx/taxa/147990-Bouvardia-ternifolia>. Recuperado el 15 de Abril del 2019.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. (1999). *Inhibitory Effect of α -Glucosidase Inhibitors Varies According to Its Origin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 550-553.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., Olokoba, L. B. (2012). *Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends*. *Oman Medical Journal*, 27(4), 269-273.
- Organización Mundial de la Salud, 2019. Accesible en línea: https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/. Recuperado 14 de Mayo del 2019.
- Pérez-Gutiérrez, R. M., Pérez-González, C., Zavala-Sánchez, M. A., Pérez-Gutiérrez, S. (1998). *Actividad hipoglucemiante de Bouvardia terniflora, Brickellia veronicaefolia, y Parmentiera edulis*. *Salud Pública México*, 40, 354-358.



- Perez-Gutiérrez, R. M., Pérez-González, C., Pérez-Gutiérrez, S., Zavala, M. A. (1998) *Effect of Triterpenoids of Bouvardia terniflora on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice*. Phytomedicine, 5(6), 475-478.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Fernandes, E. (2017). *Inhibición de la α -glucosidasa por los flavonoides: un estudio de relación estructura-actividad in vitro e in silico*. Revista de inhibición enzimática y química medicinal, 32(1), 1216-1228.
- Rangel, G. M. E. (2015). *Inhibidores de α -glucosidasas de la especie fúngica Sporomiella minimoides*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Rios, J. L., Francini, F., Schinella, R. G. (2015). *Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus*. Planta Medica, 81(12/13), 975-994.
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406.
- Sánchez V. (2017). *Herbolaria*. DGCS-UNAM. Accesible en línea: <http://www.dint.unam.mx/blog/index.php/item/3330-herbolaria>. Recuperado el 28 de Marzo del 2019.
- Santillán M. L. (2012). *El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia*. DGDC-UNAM. Accesible en línea: http://ciencia.unam.mx/leer/97/El_uso_tradicional_de_las_plantas_medicinales:_un_aporte_para_la_ciencia. Recuperado el día 16 de Marzo del 2019.
- Tropicos.org, Missouri Botanical Garden. Accesible en línea: <https://www.tropicos.org/>. Recuperado el 18 de Marzo del 2019.
- Villaseñor, J. L. y Espinosa, F. J. (1998). *Catálogo de malezas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.



- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., Zhang, W. (2014). *Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention*. International Journal of Medical Sciences, 11(11), 1185-1200.
- Zalacaín, M., Zaera, E., Vázquez, D., Jiménez, A. (1982). *The mode of action of the antitumor drug bouvardin, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells*. FEBS Letters, 148(1), 95-97.
- Zappi D. (1993). *Two cultivated species of Bouvardia*. Curti's Botanical Magazine, 10(4), 166-170.
- Zhang, Y., Wang, W., Yang, L., Zhou, D., Zhang, J. (2014). *Purification and Characterization of Flavonoids from the Leaves of Zanthoxylum bungeanum and correlation between their structure and antioxidant activity*. PLOS ONE, 9(8), 11.



10. ANEXOS

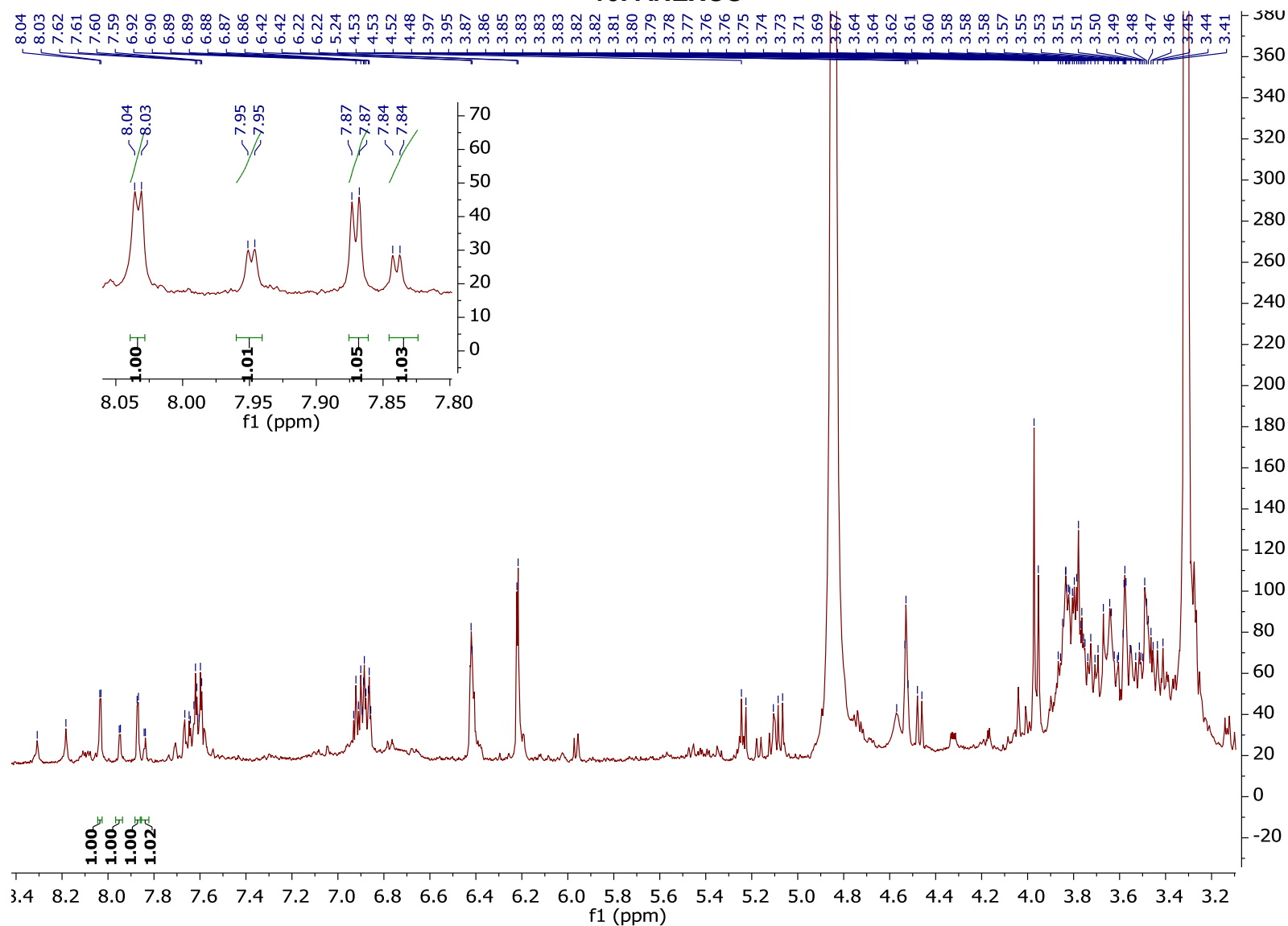


Figura A1. Espectro RMN- ^1H (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) del precipitado.

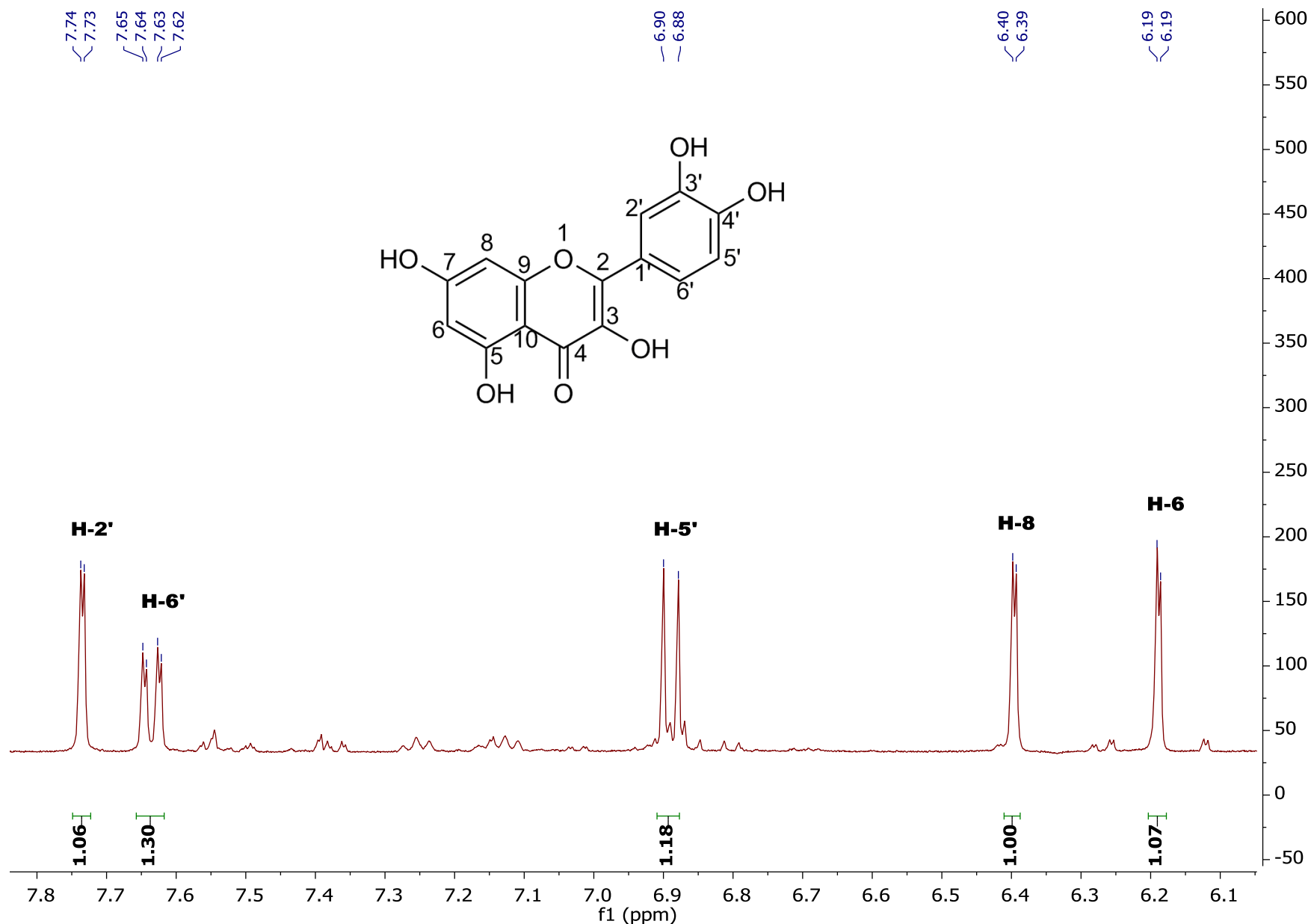


Figura A2. Espectro RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) de la quercetina (5).

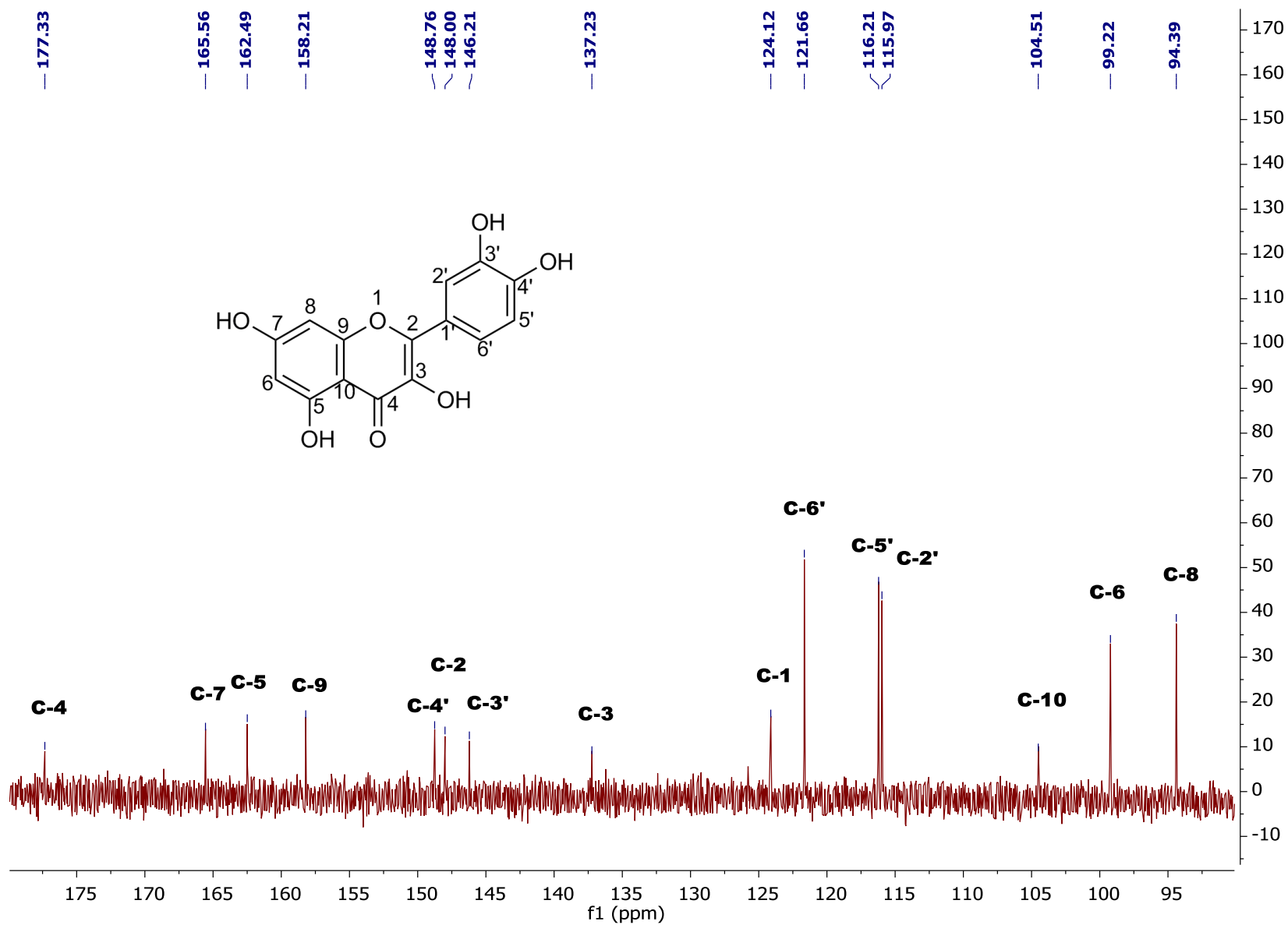


Figura A3. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CD₃OD-*d*₄) de la quercetina (5).

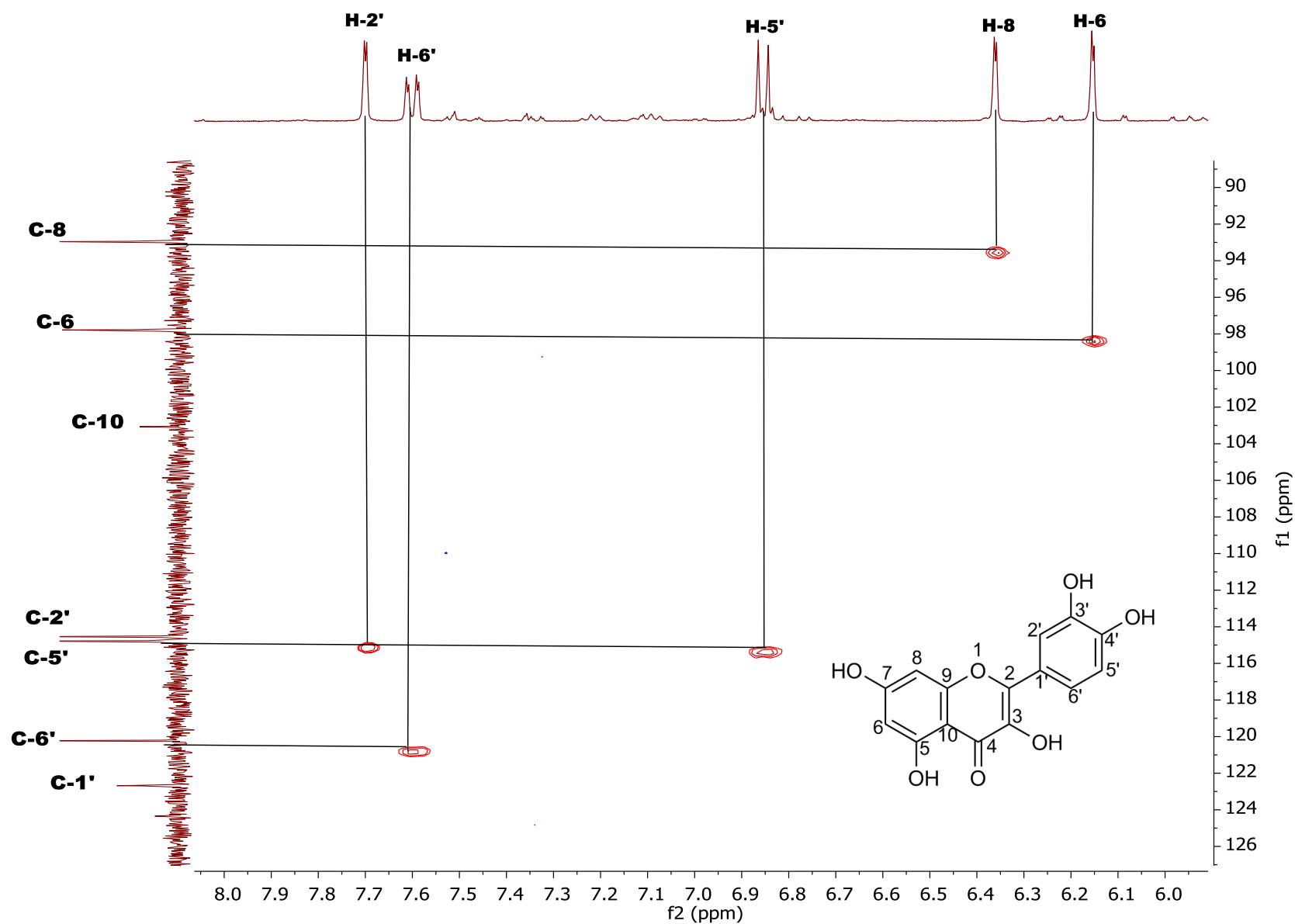


Figura A4. Espectro HSQC (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) de la quercetina (5).

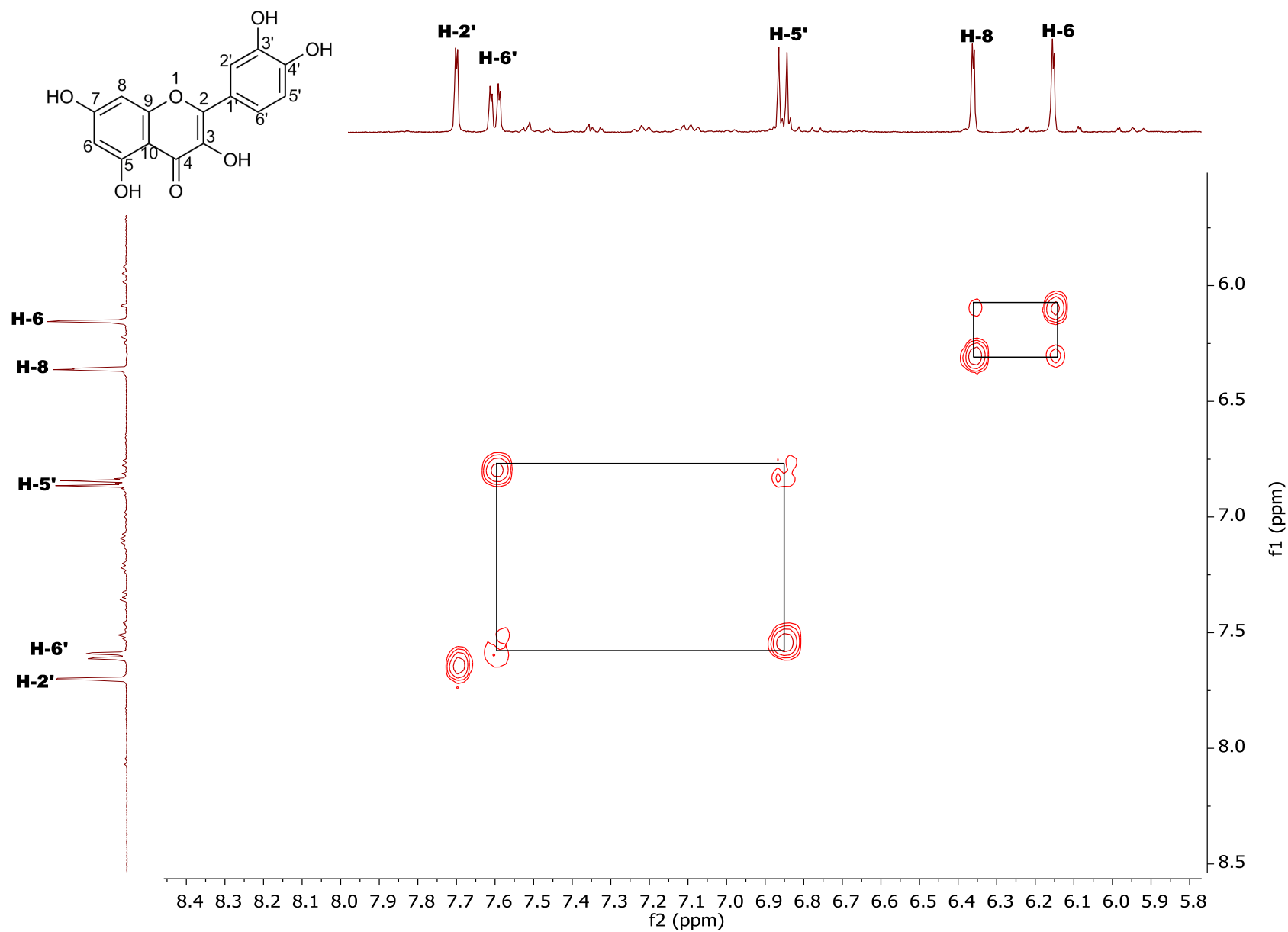


Figura A5. Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) de la quercetina (5).

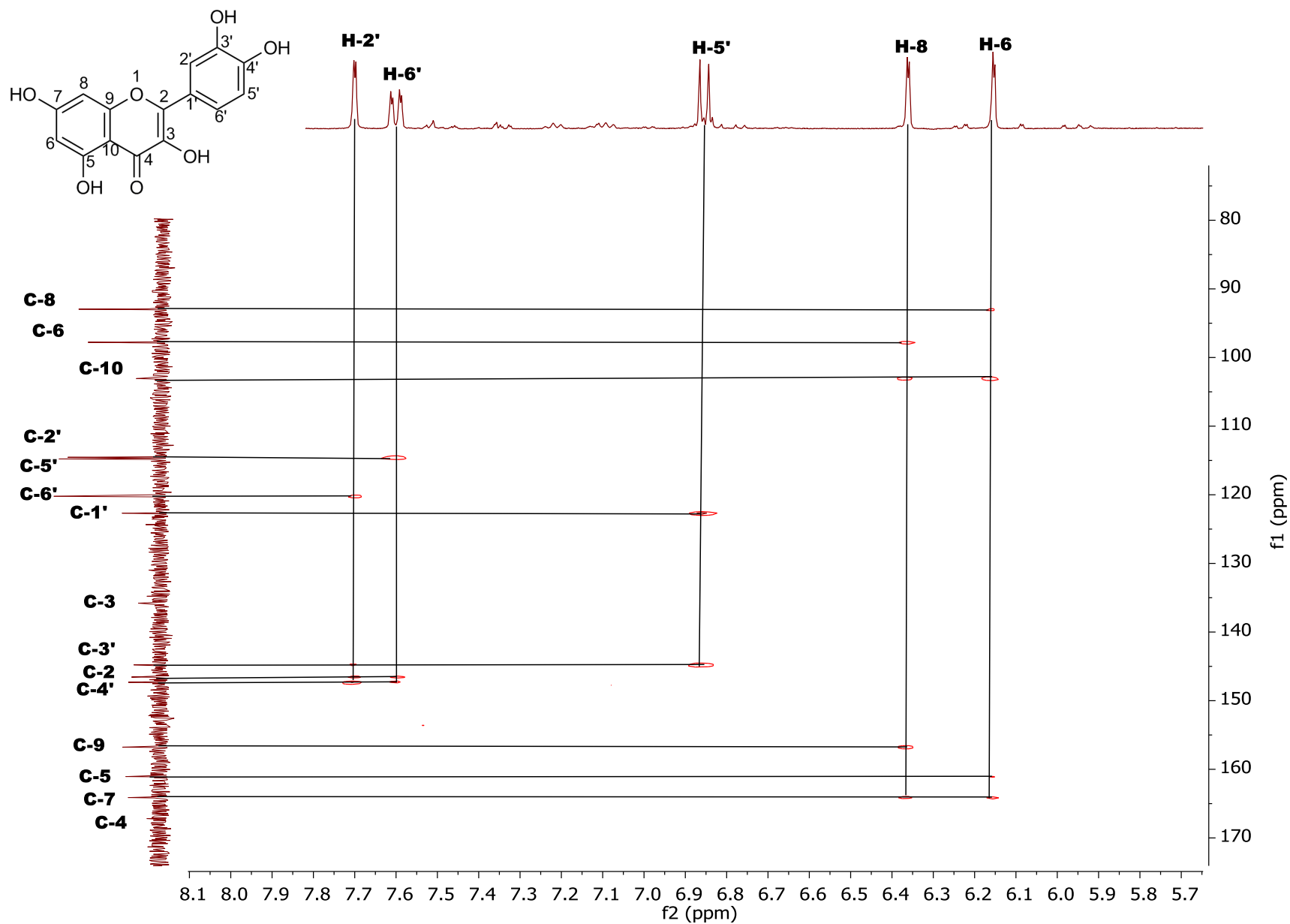


Figura A6. Espectro HMBC (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) de la quercetina (5).

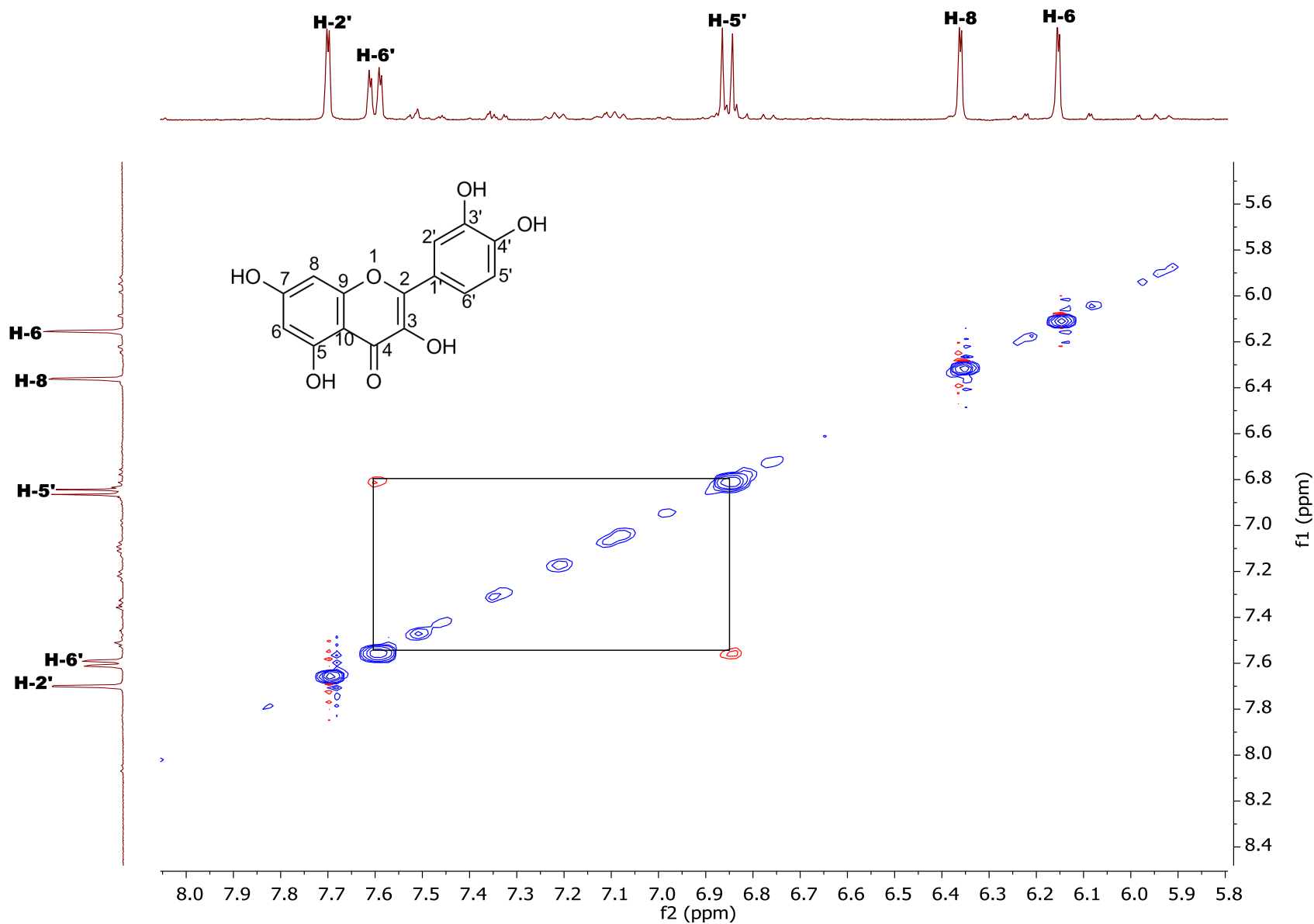


Figura A7. Espectro NOESY (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) de la quercetina (5).

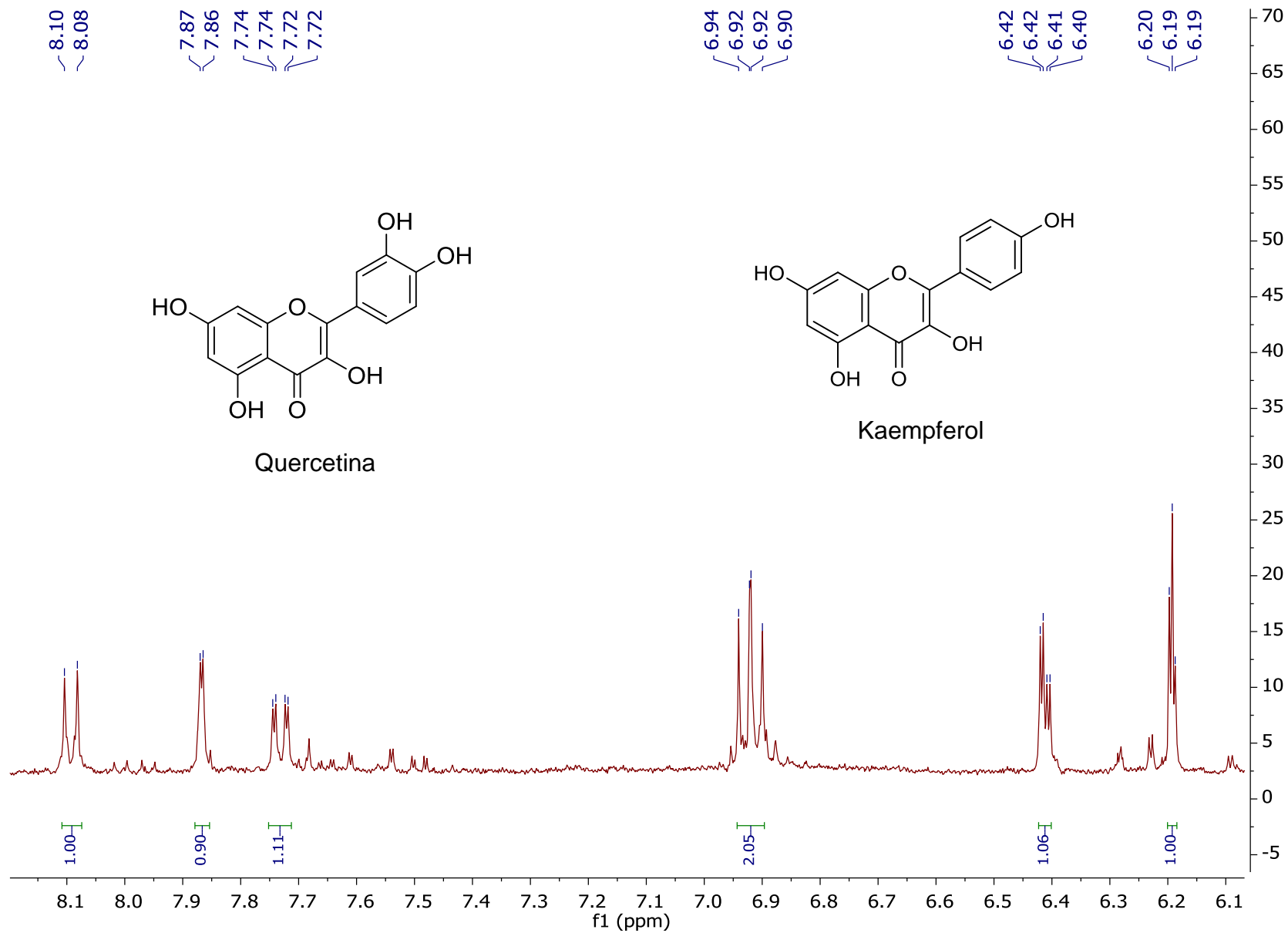


Figura A8. Espectro RMN- ^1H (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) de la fracción BtA-9.